

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer
Jetziger kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. A. Baethman

Effekt einer Antagonisierung der
 α_v -Integrine auf Angiogenese, Wachstum und
Metastasierung solider Tumoren
in vivo

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Martin Alexander Bürkle

aus

Ulm

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. G. Hartmann

Prof. Dr. M. Hallek

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. M. Dellian

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2002

Meiner Familie
Peter, Heide und Katinka Bürkle

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
1. Angiogenese: Physiologische und pathophysiologische Bildung neuer Blutgefäße.....	2
2. Mechanismen der Angiogenese von Tumoren.....	3
3. Prinzip der antiangiogenetischen Therapie.....	7
4. Antiangiogenetische Therapie durch Inhibition der α_v -Integrine.....	8
B. METHODIK	10
1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	10
2. Das Modell der transparenten Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters.....	11
2.1. Makroskopische Dokumentation der Präparation.....	13
2.2. Tumoren.....	14
2.2.1. Kultur der Tumorzellen.....	15
2.2.2. Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation.....	15
2.2.3. Implantation der Tumorzellen in die Rückenhautkammer.....	16
2.3. Dokumentation des Tumorwachstums in der Rückenhautkammer.....	16
3. Das subkutane Tumormodell unter der Rückenhaut des Syrischen Goldhamsters.....	18
3.1. Implantation der Tumorzellen unter die Rückenhaut.....	18
3.2. Dokumentation des subkutanen Tumorwachstum.....	18
4. Implantation von Verweilkathetern.....	19
5. Wiegen der Tiere.....	20
6. Zyklische Peptide zur Antagonisierung der α_v -Integrine.....	20
6.1. Zyκλο(Arg-Gly-Asp-D-Phe(N-methyl)Val; Code: EMD121974 („RGD-Peptid“).....	20
6.2. Zyκλο(Arg- β -Ala-Asp-D-Phe(N-methyl)Val; Code:EMD135981 („RAD-Peptid“).....	21
7. Fluoreszenzfarbstoffe.....	22
8. Apparative Ausstattung.....	22
8.1. Intravitalmikroskopischer Meßplatz.....	22
8.1.1. Vorbereitung und Positionierung der Versuchstiere unter den Meßplatz.....	23
8.1.2. Das optische System.....	24
8.1.3. Beleuchtung zur Fluoreszenz-Anregung.....	24
8.1.4. Strahlengang und Filterblock.....	25
8.1.5. Detektionseinheit.....	26
8.2. Videomakroskopischer Meßplatz.....	26
8.3. Auswerteeinheit.....	26

9.	Meßparameter von Tumormikrozirkulation, -Wachstum –und Metastasierung.....	28
9.1.	Parameter im Rückenhautkammermodell.....	28
9.1.1.	Funktionelle Gefäßdichte.....	28
9.1.2.	Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten.....	29
9.1.3.	Gefäßdurchmesser	30
9.1.4.	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	30
9.1.5.	Tumorfläche in der Rückenhautkammer	30
9.1.6.	Volumenfluß.....	31
9.2.	Parameter am subkutanen Tumormodell.....	32
9.2.1.	Tumordurchmesser und Berechnung des Tumolvolumens.....	32
9.2.2.	Erfassung von Metastasen	33
9.2.3.	Wachstumsverzögerung.....	33
10.	Vorversuche.....	33
10.1.	Vorversuch zur Pharmakokinetik des RGD-Peptids	33
10.2.	Vorversuch zur Anwendung des Peptids.....	34
11.	Versuchsprotokolle und Versuchsablauf.....	35
11.1.	Versuchsprotokoll zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation unter Peptidapplikation	35
11.1.1.	Ablauf des Akutversuchs zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation	36
11.2.	Versuchsprotokoll zur quantitativen Analyse des subkutanen Tumorwachstums und der Metastasierung.....	37
12.	Versuchsgruppen	38
13.	Statistische Bearbeitung und Darstellung der Ergebnisse	39
C. ERGEBNISSE.....		41
1.	Ergebnisse der Vorversuche	41
1.2.	Pharmakokinetik des RGD-Peptids	41
1.2.1.	Pharmakokinetik des RGD-Peptids nach i.v. Applikation	41
1.2.2.	Pharmakokinetik des RGD-Peptids nach i.p. Applikation	42
1.3.	Dosisfindung zur Anwendung des RGD-Peptids	43
1.4.	Zusammenfassung der Vorversuche.....	45
2.	Ergebnisse der Untersuchungen in der transparenten Rückenhautkammer	45
2.1.	Funktionelle Gefäßdichte.....	45
2.2.	Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten.....	48
2.3.	Gefäßdurchmesser	50
2.4.	Erythrozytenfließgeschwindigkeit vs. Gefäßdurchmesser	52
2.5.	Volumenfluß.....	54
2.6.	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	55
2.7.	Tumorwachstum in der transparenten Rückenhautkammer	56
3.	Ergebnisse der Untersuchungen zum subkutanen Tumorwachstum	60
3.1.	Messung des Tumorwachstums.....	60
3.2.	Wachstumsverzögerung.....	63
3.3.	Metastasierung.....	63

D. DISKUSSION	65
1. Diskussion der Methodik.....	65
1.1. Versuchsmodelle.....	65
1.1.1. Quantifizierung der Tumorangiose.....	65
1.1.1.1. Das Modell der transparenten Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters	67
1.1.2. Das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3.....	68
1.1.2.1. Dokumentation und Einschlußkriterien des A-Mel-3 in der Rückenhautkammer	69
1.1.2.2. Diskussion der Untersuchungstechniken im Rückenhautkammermodell	69
1.1.3. Messung des subkutanen Tumorwachstums und der Metastasierung	70
1.2. Antagonisierung der α_v -Integrine durch das zyklische RGD-Peptid	71
1.2.1. RGD-Peptide: Einsatz in Therapie und Diagnostik.....	71
1.2.2. Optimierung eines RGD-Peptids zur Antagonisierung der α_v -Integrine.....	73
1.2.3. Selektivität des RGD-Peptids EMD121974	74
1.3. Antiangiogenetische Tumorthherapie durch Inhibition der α_v -Integrine	75
1.3.1. Behandlung durch spezifische Antikörper.....	75
1.3.2. Behandlung mit dem zyklischen RGD-Peptid.....	76
2. Diskussion der Vorversuche zur Dosisfindung	76
2.1. Dosierung und Anwendung von RGD-Peptiden in der Literatur	76
2.2. Diskussion der Ergebnisse zur Dosisfindung	78
3. Diskussion der Ergebnisse.....	79
3.1. Rolle der Angiose beim Tumorwachstum.....	79
3.1.1. Einfluß der Integrin-Blockade auf das Tumorwachstum.....	81
3.2. Rolle der Angiose bei der Tumormetastasierung.....	84
3.2.1. Einfluß der Integrin-Blockade auf die Metastasierung.....	85
3.3. Untersuchungen in der transparenten Rückenhautkammer	86
3.3.1. Pathophysiologie der Tumormikrozirkulation.....	86
3.3.2. Angiose in der Kontrollgruppe.....	87
3.3.3. Effekt der Behandlung mit dem RGD-Peptid auf die Angiose.....	88
3.3.4. Rolle der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Angiose	92
3.3.4.1. Einfluß der Integrin-Blockade auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.	93
4. Klinische Relevanz und Ausblick.....	94
E. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	98
F. LITERATURVERZEICHNIS	100
G. VERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE DER ARBEIT	126
H. ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN	128
I. LEBENS LAUF	131

A. EINLEITUNG

Krebs ist in den industrialisierten Ländern nach wie vor die zweithäufigste Todesursache nach den Erkrankungen des Herzkreislaufsystems. Das Robert-Koch-Institut erklärte in seiner Pressemitteilung vom 04.10.1999, daß in Deutschland jährlich etwa 338.300 Menschen an Krebs erkrankten. Die meisten Krebsfälle traten im Alter von über 60 Jahren auf. Im Alter unter 60 Jahren wurden etwa 90.400 Krebsneuerkrankungen geschätzt. Damit hat sich die Zahl der Neuerkrankungen an Krebs in Deutschland gegenüber den letzten Schätzungen für das Jahr 1995 erhöht. Aber auch im Alter unter 60 Jahren hat sich, gegenüber der letzten Schätzung von 1993, v.a. bei Frauen die Zahl der Krebsneuerkrankungen erhöht. Gründe dafür liegen in der Zunahme der Neuerkrankungen an Brustkrebs und Lungenkrebs, wobei für letzteren hauptsächlich das veränderte Rauchverhalten der Frauen in den letzten Jahrzehnten verantwortlich sein dürfte. In den USA wird die Situation anhand der existierenden Krebsregister noch dramatischer eingeschätzt. Während sich möglicherweise aufgrund der besseren Aufklärung und Vorsorge der Bevölkerung die Inzidenz der Herzkreislauferkrankungen verringert, nimmt auch dort die Inzidenz von Krebserkrankungen zu. Einige Autoren sehen sogar die Möglichkeit eines Wechsels an der Spitze der häufigsten Todesursachen (Doll, 1992; Davis *et al.* 1994; Dinse *et al.* 1999; Weißbach, 2000).

In den vergangenen Jahrzehnten hat sich das Wissen über Ursachen und molekulare Grundlagen der Tumorentstehung wesentlich erhöht. Diese neuen Erkenntnisse hatten bislang jedoch nur wenig Einfluß auf die Therapie der Erkrankung: Bei der Behandlung dominieren immer noch die drei klassischen Säulen der Onkologie: Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie. Die chirurgische Intervention stellt eine hochselektive Maßnahme dar, doch es bestehen Limitationen durch die Invasivität des Eingriffs und bei der metastasierten Krebserkrankung. Chemotherapie und Strahlentherapie hingegen stellen gering invasive Verfahren dar, die auch gegen einzelne, verstreute Tumorzellen oder multiple Metastasen wirksam sind. Der Nachteil

besteht in einer oft nicht ausreichenden Selektivität, weshalb zum Teil gravierende Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen. Intensive Forschungsaktivitäten in den vergangenen Jahren haben zwar die Behandlungserfolge dieser drei Standardmethoden weiter verbessern, aber nur wenige erfolgreiche Alternativen zur Behandlung des Krebsleidens hinzufügen können. Diese Situation erzwingt geradezu die Suche nach neuen Strategien, um die Volkskrankheit Krebs heilen zu können.

Schon früh wurde der Gedanke geäußert, daß neben den Tumorzellen selbst die den Tumor versorgenden Gefäße geeignete therapeutische Angriffspunkte darstellen könnten. (Folkman, 1971; Burrows & Thorpe, 1994). Das Ziel besteht darin, den Tumor gleichsam „auszuhungern“, indem man ihn von der Blutzufuhr, also von der Versorgung mit Nährstoffen abschneidet. Bis heute konnten in der antiangiogenetischen Tumorthherapie vielversprechende experimentelle Fortschritte erzielt werden. Dennoch besteht immer noch ein großer Bedarf an experimenteller und klinischer Forschung, bevor diese neue Art der Tumorthherapie sich in der Klinik bewähren kann. (Harris, 1998; Cohen, 1999).

1. Angiogenese: Physiologische und pathophysiologische Bildung neuer Blutgefäße

Die Bildung von neuen Blutgefäßen findet im menschlichen Körper im Wesentlichen bei zwei physiologischen Vorgängen statt, zum einen in der Vaskulogenese des sich entwickelnden Embryos, zum anderen im Verlauf des weiblichen Menstruationszyklus (D'Amore & Thompson, 1987; Folkman & Shing, 1992). Eine zentrale Rolle nimmt die Angiogenese bei einer Reihe von pathophysiologischen Vorgängen ein (Folkman, 1995a). Dazu gehören die Wundheilung (Clark *et al.* 1982) und ophthalmologische Erkrankungen wie die diabetische Retinopathie. Die retinale Neovaskularisation ist eine Hauptursache für den Verlust des Sehvermögens. Hypoxie in der Retina bewirkt die Sekretion angiogenetischer Faktoren in retinalen Stromazellen. Damit wird die Bildung von neuen Blutgefäßen in der Netzhaut induziert (Hammes *et al.* 1996). Ebenso ist die Angiogenese an der Pathogenese einer Reihe von inflammatorischen Erkrankungen wie

z.B. der rheumatoiden Arthritis oder der Psoriasis beteiligt (Auerbach & Auerbach, 1994; Folkman, 1995a).

Eine entscheidende Rolle nimmt die Angiogenese bei Wachstum und Metastasierung von soliden Tumoren und einigen Leukämieformen ein (Folkman, 1990; Aguayo *et al.* 2000). Pionier auf diesem Gebiet, der in den 1960er und 1970er Jahren die ersten Untersuchungen zur Tumorangiogenese lieferte, war Judah Folkman (Folkman *et al.* 1963; Folkman, 1971). Seitdem hat sich das Wissen über die Rolle der Angiogenese beim Tumorwachstum erhöht, ihre essentielle Bedeutung für die Tumorprogression wird nicht mehr angezweifelt. Ein wesentlicher Faktor, der den Verlauf der Krebserkrankung bestimmt, ist die systemische Streuung von Tumorzellen durch den Primärtumor und die anschließende Bildung von Tochtergeschwülsten. Angiogenese scheint dabei am Anfang wie auch am Ende dieser Kaskade von Bedeutung zu sein (Fidler & Ellis, 1994).

2. Mechanismen der Angiogenese von Tumoren

Aufgrund der Erkenntnisse über die Notwendigkeit der Angiogenese für Wachstum und Metastasierung von Tumoren wurde sehr rasch angenommen, daß sich durch Hemmung der Angiogenese eine neue therapeutische Strategie zur Behandlung des Krebsleidens ergeben könnte. Die möglichen Ansatzpunkte sind vielfältig und ergeben sich aus dem komplexen Prozeß der Tumorangiogenese (Abb. 1):

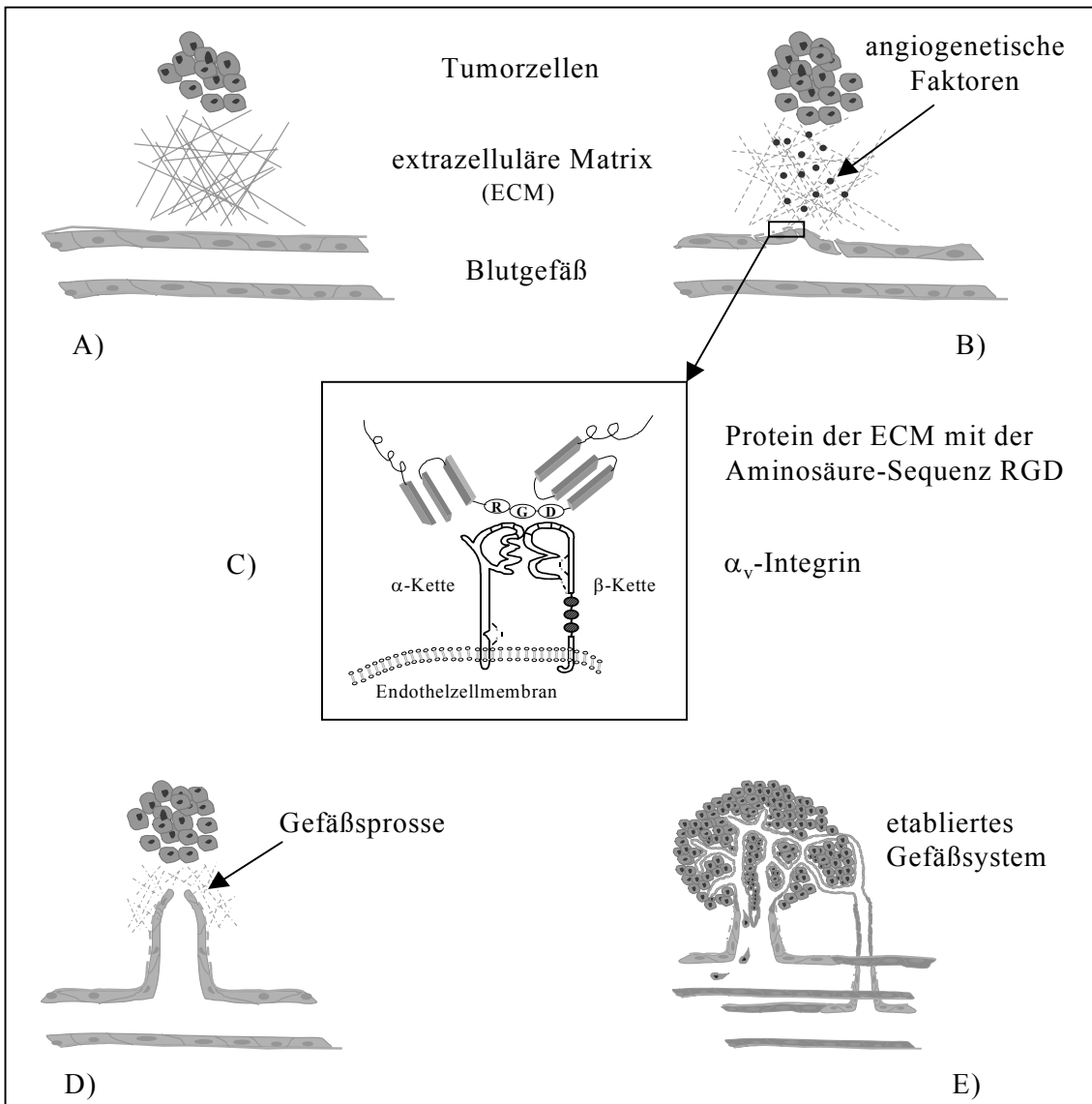


Abbildung 1: Tumorangio-genese

Schematisch ist ein Tumorzellaggregat, die umgebende extrazelluläre Matrix (ECM) und ein Blutgefäß dargestellt (A). Die Sekretion angiogener Wachstumsfaktoren durch die Tumorzellen veranlaßt die Endothelzellen im benachbarten Blutgefäß zur Proliferation und Migration in Richtung Stimulus (B). Dabei exprimieren die Endothelzellen an ihrer Oberfläche Integrine, mit deren Hilfe sie an Bestandteile der ECM binden können (C). Die Ausschnittsvergrößerung zeigt ein solches Integrin, bestehend aus einer alpha und beta Kette, wie es an ein Protein der ECM mit der Aminosäuresequenz Arginin, Glycin und Aspartat (RGD) bindet. Bei der Migration in Richtung Tumor bilden die Endothelzellen dabei die für die Angio-genese typischen Gefäßsprosse (D). Am Ende dieser Vorgänge hat sich ein funktionelles Gefäßsystem etabliert. Die Versorgung des Tumors mit Substraten, sowie sein Wachstum und die Metastasierung ist gewährleistet (E).

Maligne entartete Zellen können oft jahrelang scheinbar „schlafend“ im Gewebe vorliegen (tumor dormancy). Dabei ernähren sie sich nur durch Substrate, die aus benachbarten Blutgefäßen in das Gewebe diffundieren (Folkman *et al.* 1989) (Abb. 1A). Die Ursache dafür, daß der Tumorzellverband plötzlich eine angiogenetische Aktivität entwickelt, ist noch weitgehend unklar. Die Aktivierung von Endothelzellen stellt aber einen der ersten Schritte dar (Folkman *et al.* 1989; Senger *et al.* 1996). Dieses „Umschalten“ von einem „schlafenden“ (dormant) Tumorzellverband in einen endothelzellaktivierenden, wachsenden Tumor wurde von Folkman als „Angiogenic Switch“ bezeichnet (Abb. 2).

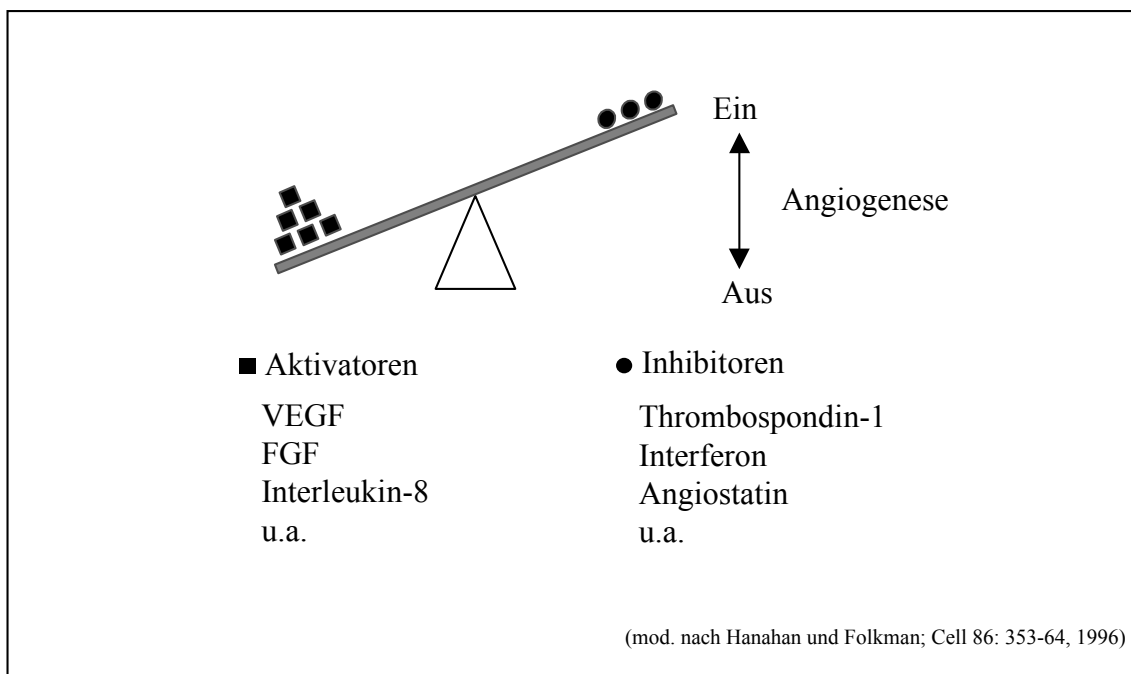


Abbildung 2: Modell des „Angiogenic Switch“

Die Hypothese des „Angiogenic Switch“ geht davon aus, daß ein Schaltermechanismus die Angiogenese kontrolliert, getriggert durch eine Balance aus proangiogenen und antiangiogenen Faktoren. In der „Aus-Position“ überwiegen die Inhibitoren der Angiogenese. Durch einen Stimulus, z.B. Hypoxie in den Tumorzellen, werden vermehrt Aktivatoren der Angiogenese produziert und sezerniert. Dadurch kommt es zu einem Übergewicht angiogenetischer Faktoren und der Schalter gerät in die „Ein-Position“. Die Angiogenese beginnt.

Darunter wird eine Art Schaltermechanismus verstanden, der durch Aktivatoren (z.B. Vascular Endothelial Growth Factor und Basic Fibroblastic Growth Factor) und Inhibitoren der Angiogenese (z.B. Interferon, Angiostatin) getriggert wird (Hanahan & Folkman, 1996; Folkman, 1997). Solange die Tumorzellen „schlafend“ im Gewebe vorliegen, überwiegen die Inhibitoren der Angiogenese, bzw. besteht ein Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Regulatoren. Veränderungen in diesem Gleichgewicht aktivieren den „Schalter“, d.h. entweder eine Abnahme der Inhibitoren bzw. eine Zunahme der Aktivatoren führen zur Induktion des angiogenetischen Prozesses durch die Tumorzellen.

Die so aktivierten Endothelzellen verändern sich und setzen proteolytische Enzyme frei, die das umgebende Gewebe andauen und so den Weg frei machen für die Einsprossung der Endothelzellen (Abb. 1B). Zu den proteolytischen Enzymen gehören Metalloproteinasen wie die Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) (Ray & Stetler Stevenson, 1994; Brooks *et al.* 1998). Ihr wird desweiteren eine wichtige Funktion im Rahmen des „Remodelling“ der extrazellulären Matrix (ECM) und der Migration der Endothelzellen in Richtung angiogenen Stimulus zugeschrieben. Die aktivierten Endothelzellen sind noch unreif und benötigen eine Matrix, um sich als Gefäß zu etablieren. Sie produzieren Matrixkomponenten und heften sich an diese Matrix mit Hilfe eigens exprimierter Adhäsionsmoleküle. Zu diesen gehören unter anderem die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ (Ruoslahti & Reed, 1994; Benjamin *et al.* 1999; Erdreich-Epstein *et al.* 2000). Diese Integrine binden einerseits an ihrer Rezeptorseite Proteine der ECM welche die Aminosäuresequenz Arginin, Glycin und Aspartat (RGD) aufweisen (Abb. 1C), andererseits binden sie RGD-unabhängig die MMP-2. Durch diese Assoziation wird nicht nur das „Remodelling“ der ECM erleichtert, sondern gleichzeitig auch die Migration der Endothelzelle ermöglicht (Brooks *et al.* 1998; Eliceiri & Cheresh, 1999).

Die Endothelzellen wachsen in Richtung chemotaktischer Faktoren zunächst als sogenannte Gefäßsprossen heran, die dann im Verlauf ein Lumen bilden (Abb. 1D). Die Basalmembran wird neu gebildet und schließlich werden Perizyten rekrutiert, die ein umgebendes Stützgewebe formen (Hammersen *et al.* 1985; Risau, 1997). Das Ergebnis ist ein dreidimensionales, funktionierendes Gefäßnetz, das die Versorgung des Tumors

mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellt und Wachstum und Metastasierung ermöglicht (Sutherland, 1988) (Abb. 1E).

3. Prinzip der antiangiogenetischen Therapie

Der oben geschilderte Prozeß der Tumorangiogenese bietet zahlreiche potentielle Möglichkeiten, therapeutisch im Sinne einer antiangiogenetischen Therapie einzugreifen. Das Prinzip besteht darin, einzelne oder mehrere Schritte zu blockieren, um so die Etablierung eines suffizienten Gefäßsystems im Tumor zu verhindern, bzw. einen bereits vaskularisierten Tumor von der Substratversorgung abzuschneiden. Somit würde Wachstum und Metastasierung des Tumors inhibiert sein. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über gegenwärtige experimentell-therapeutische Ansätze zur antiangiogenetischen Therapie.

Tabelle 1: Angriffsmechanismen antiangiogenetischer Substanzen

Mechanismus	Substanzen	Literatur
Angiogeneseinhibitor durch Antagonisierung angiogener Wachstumsfaktoren	Anti-VEGF-AK; Thalidomid; SU5416; SU6668; IFN-alpha; Suramin	(Borgstroem <i>et al.</i> 1996; Fong <i>et al.</i> 1999)
Angiogeneseinhibitor durch Hemmung der Metalloproteinasen	Marimastat; Penicillamin; COL-3 (Tetracyclinderivat) AG3340; Neovastat; PEX	(Brooks <i>et al.</i> 1998; Ray & Stetler Stevenson, 1994)
Angiogeneseinhibition durch Hemmung der Endothelzellproliferation –und Migration	TNP-470 (Fumagillinderivat); Endostatin; Angiostatin; Squalamin; Farnesyl Transferase Inhibitor; Combretastatin	(Harris, 1998; Ingber <i>et al.</i> 1990; Teicher <i>et al.</i> 1998)
Angiogeneseinhibition durch Chelatbildung mit Kupfer	Penicillamin; Captopril; Tertrathiomolybdate	(Brem, 1999; Brem <i>et al.</i> 1990)
Angiogeneseinhibition durch Antagonisierung des Integrins $\alpha_v\beta_3$	Vitaxin (LM609); EMD1211974	(Brooks <i>et al.</i> 1994a; Buerkle <i>et al.</i> 2000, 2002)
Angiogeneseinhibition durch unspezifische Mechanismen	Interleukin-12; CAI; ABT- 627; IM862; PNU-145156E	(Brem, 1999)

4. Antiangiogenetische Therapie durch Inhibition der α_v -Integrine

Die Rolle bestimmter Adhäsionsmoleküle scheint in der Tumorangio-genese von besonderer Bedeutung zu sein. Mitglieder der Integrinfamilie nehmen eine Schlüsselposition beim Wachstum von neuen Blutgefäßen ein, indem sie Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen ermöglichen (Hynes, 1992; Luscinskas & Lawler, 1994). Ihre Funktion bzw. ihr Vorkommen wird definiert durch die Kombination ihrer alpha und beta Untereinheiten, von denen gegenwärtig 15 bzw. 8 bekannt sind. Den Leukozyten ermöglichen sie zum Beispiel die Adhäsion an die Endothelzellen und die Emigration in den extravasalen Raum, die Funktion von Thrombozyten ist ebenfalls von bestimmten Integrinen abhängig (Hynes, 1992; Tschopp *et al.* 1994).

Für die Angiogenese sind die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch $\alpha_v\beta_5$ von Bedeutung (Cheresh, 1992; Eliceiri & Cheresh, 1999). Exprimiert auf Endothelzellen, binden sie an eine Reihe von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM), welche die Aminosäuresequenz Arginin Glycin und Aspartat (RGD) aufweisen (Abb. 1C). Dies sind vor allem Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen, Thrombospondin, Osteopontin und von Willebrand Faktor (Brooks, 1996). Antikörper und synthetische RGD-Peptide, die gegen die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ gerichtet sind, hemmen *in vitro* die Formation von Endothelzellen in Matrixgel-Essays (Nicosia & Bonanno, 1991; Brooks, 1996; Bayless *et al.* 2000). Die entscheidenden Untersuchungen, daß das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auch in der Tumorangio-genese eine wichtige Rolle spielt, kamen von David Cheresh und Peter Brooks (Brooks *et al.* 1994a; Brooks *et al.* 1994b). Sie konnten in der Chorioallantoismembran (CAM) zeigen, daß die Blockierung des Integrins mit dem spezifischen Antikörper LM 609 die Funktion proteolytischer Enzyme wie der Metalloproteinasen beeinträchtigt und in Endothelzellen Apoptose veranlaßt (Brooks *et al.* 1996). Resultat war eine Inhibition der Angiogenese in der CAM. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Expression der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ auf dem mikrovaskulären Endothel mit der Aggressivität des Neuroblastoms korreliert (Erdreich-Epstein *et al.* 2000).

Die Blockierung der RGD-abhängigen Integrinfunktion mit einem kleinmolekularen Peptid-Antagonisten würde daher eine potentielle weitere Möglichkeit für eine

antiangiogenetische Therapie darstellen. Die Entwicklung eines für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ hochselektiven, methylierten zyklischen RGD-Peptids gelang der Arbeitsgruppe von M. Dechantsreiter und H. Kessler (Dechantsreiter *et al.* 1999). Der Effekt dieses neuartigen RGD-Peptids auf Wachstum und Angiogenese von soliden Tumoren *in vivo* ist bislang noch nicht geklärt gewesen. Die oben geschilderten Untersuchungen von Brooks und Mitarbeitern an der CAM waren zeitlich auf 48 Stunden begrenzt. Somit läßt dieser experimentelle Ansatz keine Aussagen darüber zu, welchen Effekt der Integrinantagonist über einen längeren Zeitraum in einem komplexen Organismus auf Angiogenese, Wachstum und auch die Metastasierung ausübt (Jain *et al.* 1997).

Das amelanotische Hamster Melanom A-Mel-3 subkutan bzw. in der transparenten Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters stellt ein ausgezeichnetes und etabliertes Modell dar, um Angiogenese, Wachstum und Metastasierung nicht-invasiv und kontinuierlich über einen längeren Zeitraum *in vivo* zu beobachten (Asaishi *et al.* 1981; Endrich *et al.* 1982a; Vajkoczy *et al.* 2000). Die direkte Observation der Tumormikrozirkulation in der Rückenhautkammer während der Anwendung des RGD-Peptids dürfte außerdem neue Einsichten in die Mechanismen der antiangiogenetischen Therapie bieten.

Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, den Effekt eines zyklischen RGD-Peptids als Integrinantagonist auf Angiogenese, Wachstum und Metastasierung von Tumoren *in vivo* zu untersuchen.

B. METHODIK

1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Die im folgenden dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden in der Zeit von Februar 1997 bis März 1998 am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer durchgeführt.

Als Versuchstiere dienten sechs bis acht Wochen alte männliche Syrische Goldhamster (*Mesocricetus aureatus*) mit einem mittleren Körpergewicht von 50 g (45-55 g).

Die Tiere stammten aus dem Inzuchtstamm der Firma Charles River (Sulzfeld) und wurden, jeweils zwei Hamster in einem Käfig, im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 24° C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50%. Es bestand ein 12-stündig wechselnder Licht-Dunkel-Rhythmus. Den Tieren wurden zur Gewöhnung an die später durchzuführenden Versuche transparente Plexiglasröhren in die Käfige gelegt. Goldhamster, welche die Röhren konstant mieden, wurden nicht in die Versuche einbezogen. Nach Implantation der Tumorzellen wurden Versuchstiere, die die Tumoren subkutan trugen für zwei Tage, und Tiere mit Tumoren in der Rückenhautkammer vier Tage in einem Intensivpflege-Inkubator (Modell 7510; Dräger-Werk AG; Lübeck) untergebracht. Darin wurde eine Temperatur von 32° C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% eingestellt, um die Angehrate der implantierten Tumorzellen hoch zu halten.

2. Das Modell der transparenten Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters

Als tierexperimentelles Modell zur Beobachtung der Tumormikrozirkulation diente die transparente Rückenhautkammer, welche am Institut für Chirurgische Forschung entwickelt wurde (Endrich *et al.* 1980; Asaishi *et al.* 1981). Die Technik dieses Modells wurde bereits vielfach angewendet und ist international hinsichtlich mikrozirkulatorischer Untersuchungen etabliert. Für detaillierte Informationen sei speziell auf die Dissertationsarbeit von A.E. Goetz bzw. nachfolgende Publikationen der Arbeitsgruppen verwiesen (Endrich *et al.* 1982a; Goetz, 1987; Dellian *et al.* 1995).

Die Versuchstiere wurden zunächst mit einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital (50mg/kg KG; Nembutal, Sanofia-Leva, Hannover) narkotisiert. Nach Bedarf wurde die Narkose durch zusätzliche Gaben von Pentobarbital (10mg/kg KG) aufrecht erhalten. Mit einem Langhaarrasierer (Aesculap) wurde der Rücken der Tiere rasiert und anschließend chemisch depiliert (Pilcamed, Schwarzkopf). Die Rückenhaut wurde feucht gereinigt und mit 70%-igem Alkohol desinfiziert. Diaphanoskopisch ließ sich nun die Struktur und der Verlauf der subkutanen Arteriolen und Venolen beurteilen. Danach folgte die Implantation der transparenten Rückenhautkammer (Werkstatt, Institut für Chirurgische Forschung), welche aus zwei konvexen, spiegelbildlich gleich großen Titanplatten besteht. Vor der Implantation wurden Rückenhautkammer und Instrumente sterilisiert. Nach Markierung der Mittellinie wurde durch Transillumination die Gefäßversorgung in der Rückenhaut lokalisiert und das Präparationsareal festgelegt. Anschließend wurde eine Kammerhälfte am Oberrand der Hamsterrückenhaut über der Mittellinie mit zwei Haltefäden fixiert.

Die weitere Präparation erfolgte in Seitenlage, so daß die jetzt noch freie Hauthälfte dem Präparator zugewandt war. In dem kreisrunden Hautareal, über welchem das Beobachtungsfenster der anderen Kammerhälfte zu liegen kommen sollte, wurden das kutane als auch das subkutane Gewebe der zugewandten Hautseite mikrochirurgisch abpräpariert und damit die intakte Schicht der gegenüberliegenden Epidermis mit subkutanem Gewebe, versorgenden Gefäßen und dem Hautmuskel zur Darstellung gebracht. Nach Abschluß der chirurgischen Präparation wurde die kontralaterale

Kammerhälfte aufgesetzt und mit drei Muttern an den drei Schrauben der gegenüberliegenden Platte befestigt. Der Abstand der beiden Platten voneinander betrug 450 µm und wurde durch entsprechende Unterlegscheiben als Platzhalter gewährleistet. Die subkutane Schicht der Gegenseite schmiegte sich durch Adhäsionskräfte an das Sichtfenster an. Die Hautfalte wurde durch weitere vier Haltefäden (Ethibond, 5-0, Fa. Ethikon, Norderstedt) in den vorgesehenen Bohrungen am Kammerrand fixiert. Das Fenster der Kammer war mit einem sterilen Deckglas (ø 11,7 mm, Fa. Menzel, Braunschweig) und einem Sprengring verschlossen. Dadurch konnten die anliegenden Gefäße des Musculus cutaneus maximus ständig makroskopisch als auch mikroskopisch beobachtet werden. Abbildung Nr. 3 zeigt die fertige Präparation der transparenten Rückenhautkammer.

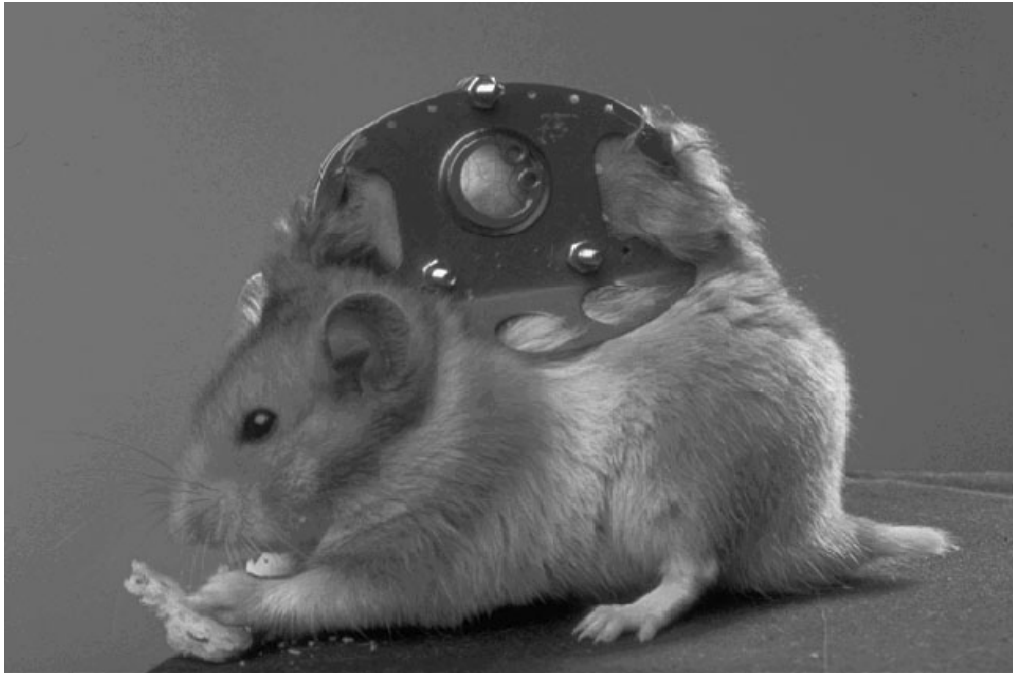


Abbildung 3: Transparente Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters

Das Foto zeigt einen Syrischen Goldhamster, der die transparente Rückenhautkammer auf dem Rücken trägt. Das Modell wurde am Institut für Chirurgische Forschung von Endrich und Mitarbeitern entwickelt (Endrich *et al.* 1982).

2.1. Makroskopische Dokumentation der Präparation

Nach Implantation der transparenten Rückenhautkammer wurde mit einem Photomakroskop (Leitz) und einer daran angeschlossenen Videokamera (XC-77; Sony) das im Bereich des Fensters einzusehende Gewebe mit Gefäßsystem dokumentiert. Die Übersichtsaufnahmen wurden täglich angefertigt (Abb. 4). Erfüllte die Präparation am zweiten Tag die Kriterien einer intakten Mikrozirkulation (Goetz, 1987), so kam das Versuchstier für die anschließende Implantation der Tumorzellen in Frage.

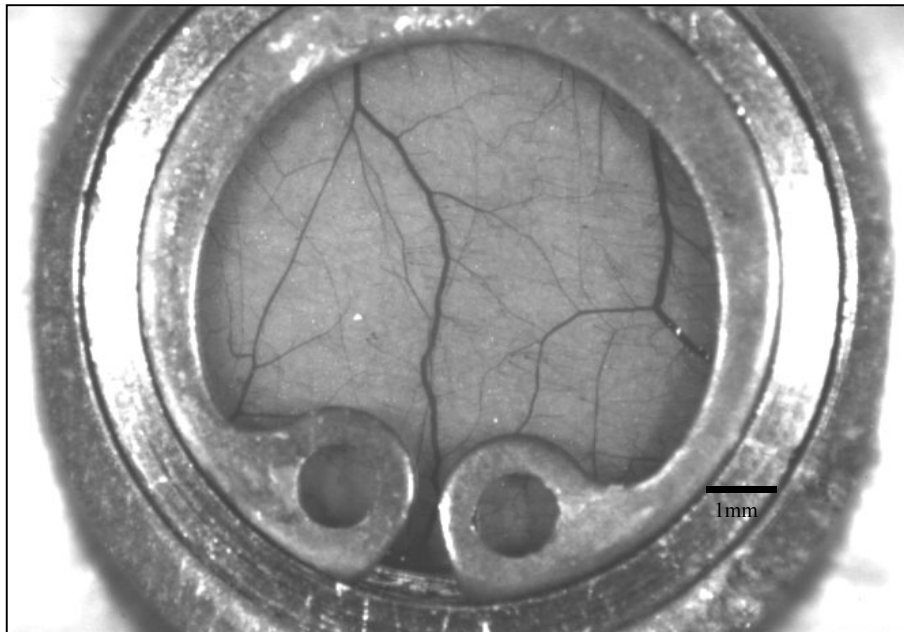


Abbildung 4: Transparente Rückenhautkammerpräparation

Das Foto zeigt eine videomakroskopische Aufnahme der transparenten Rückenhautkammer ohne Tumor, die den Anforderungen einer intakten Mikrozirkulation genügt. Man sieht durch das Deckglas auf das subkutane Gewebe der Hamsterrückenhaut. Bei den durchziehenden Gefäßen erkennt man Arterien und Venen. Es finden sich innerhalb der Präparation keine Anzeichen einer Entzündung. Der Durchmesser des Beobachtungsfensters beträgt etwa 11mm.

2.2. Tumoren

Als Tumormodell diente das am Institut für Chirurgische Forschung als Zelllinie gehaltene amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3 (Fortner *et al.* 1961). Für alle Versuche wurden Tumorzellen der Kulturpassagen 11 bis 15 verwendet, um gut vergleichbare Tumoren zu erhalten. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden die Tumorzellen des A-Mel-3 dazu in einer kontinuierlich laufenden Zellkultur gehalten, um jeweils alle drei Tage „geerntet“ werden zu können.

2.2.1. Kultur der Tumorzellen

Für Kultur- und Einfriermedium wurde einem Liter Waschmedium (RPMI (PAN Biotech, Aichenbach)) 10 ml einer 1%-igen Lösung von Penicillin und Streptomycin zugesetzt, entsprechend 10^5 I.E. Penicillin und 10^5 I.E. Streptomycin (beide Biochrom KG, Berlin). Dem Kulturmedium wurden weiterhin 10% fetales Kälberserum (FKS; GIBCO-BRL, Eggenstein) zugegeben, dem Einfriermedium 20% FKS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva, Heidelberg).

Zur Passage *in vitro* wurden die Zellen in Kulturmedium suspendiert und in Zellkulturflaschen (Cellstar, Frickenhausen) ausgesät. In einem Brutschrank (CO₂-Auto-Zero Typ B 5061 EK-02; Heraeus, Hanau) wurden sie bei 37° C, 90% Luftfeuchtigkeit und mit 5% CO₂-angereicherter Luft gezüchtet. Durch Ablösen mit Trypsin-EDTA (Boehringer, Mannheim) konnten die Zellen alle drei Tage geerntet werden und entweder eingefroren, weiter gezüchtet oder entsprechend dem in 2.2.3. und 3.1 beschriebenen Vorgehen für den Versuch implantiert werden.

2.2.2. Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation

Die bebrüteten Zellkulturschalen wurden zunächst unter dem Mikroskop hinsichtlich der Dichte des Zellrasens beurteilt. Drei Tage nach dem Aussäen bildeten die Zellen in der Regel einen dichten Zellrasen, so daß sie geerntet werden konnten. Das Kulturmedium wurde zunächst abgegossen. Pro benötigte Zellkulturschale wurden zum Ablösen der Zellen jeweils 10 ml Trypsin-EDTA (Boehringer, Mannheim) in die Schalen gegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit von fünf Minuten wurden 15 ml RPMI zugegeben und nun der gesamte Inhalt der Schale in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation mit 450 G wurde der Überstand abgegossen und das Röhrchen erneut mit RPMI aufgefüllt, die Zellen darin suspendiert und anschließend wieder zentrifugiert. Diese Prozedur wurde dreimal durchgeführt. Vor der letzten Zentrifugation wurde in einer Probe der Suspension durch Auszählen mit einem Hämocytometer die Gesamtzahl der Zellen bestimmt und durch Trypanblaufärbung die

Zellvitalität ermittelt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und die verbleibende Zellsuspension mit einer 1 ml Tuberkulinspritze aspiriert.

2.2.3. Implantation der Tumorzellen in die Rückenhautkammer

Zwei Tage nach Präparation der Rückenhautkammer wurden die Tiere in Plexiglasröhren immobilisiert und auf einem Plastiktisch fixiert. Sprengring und Deckglas wurden nach vorhergehender Befeuchtung des Areal entfernt. In das zentral gelegene Areal der Kammerpräparation wurde ein Mikroliter (ca. $2-5 \cdot 10^5$ Tumorzellen) der Tumorzell-suspension aufgebracht. Anschließend wurde das Fenster mit einem neuen, sterilen Deckglas und dem Sprengring verschlossen.

2.3. Dokumentation des Tumorwachstums in der Rückenhautkammer

Zur Kontrolle der einzelnen Präparationen im Rahmen des 15-tägigen Versuchsablaufes und zur Dokumentation des Tumorwachstums wurden alle zwei Tage photomakroskopische Aufnahmen des Kammerareals durchgeführt (Abb. 5). Hierzu wurde das Photomakroskop (Leitz) mit einer Kaltlichtquelle (MTR 28; Wild, Heerbrugg, Schweiz) und einer Belichtungsautomatik (Photoautomat MPS 55/51, Wild, Heerbrugg, Schweiz) versehen. Als Filmmaterial diente ein Kodak Ektachrom 64 T Kunstlicht Farbfilm.

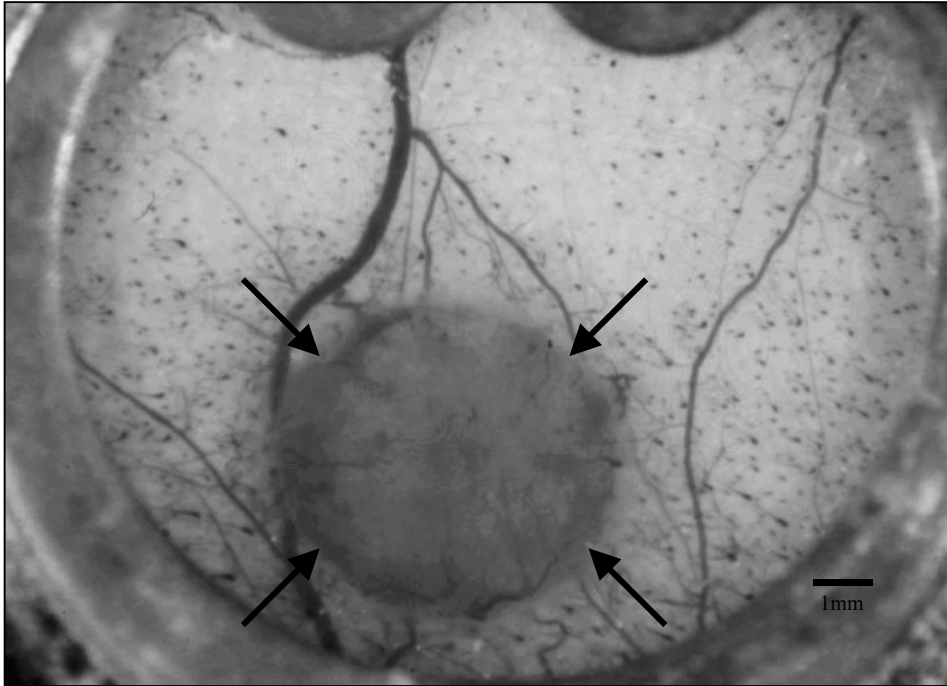


Abbildung 5: A-Mel-3 in der transparenten Rückenhautkammer

Auf dem Foto ist der Tumor A-Mel-3 5 Tage nach Tumorzellimplantation zu sehen. Der Durchmesser des Tumors beträgt ca. 6mm. Die Pfeile markieren den Tumorrand. Das Gefäßsystem zeigt eine hohe Heterogenität mit typischen Kalibersprüngen und Schlängelung der Gefäße. Teilweise sind kleine Hämorrhagien zu erkennen, die durch die hohe Fragilität der Tumorgefäße zustande kommen. Durch den hohen interstitiellen Druck hat sich im Randbereich ein Ödem ausgebildet. Der Durchmesser des Beobachtungsfensters beträgt etwa 11mm.

3. Das subkutane Tumormodell unter der Rückenhaut des Syrischen Goldhamsters

3.1. Implantation der Tumorzellen unter die Rückenhaut

Der Effekt auf Tumorwachstum und Metastasierung wurde an soliden, subkutan implantierten Tumoren der gleichen Zelllinie des A-Mel-3 untersucht.

Vor Implantation der Tumorzellen wurden die Versuchstiere zunächst mit einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital (50mg/kg KG; Nembutal, Sanofia-Leva, Hannover) narkotisiert. Mit dem Langhaarrasierer wurde der gesamte Rücken der Tiere rasiert und anschließend chemisch depiliert (Pilcamed, Schwarzkopf). Die Rückenhaut wurde feucht gereinigt und mit 70%-igem Alkohol desinfiziert. In der lumbosacralen Region wurden mit einer auf die Tuberkulinspritze aufgesetzten Einmalkanüle (Größe 20; 0,42 * 22 mm) subkutan 10 µl der Zellsuspension injiziert. Die Anzahl der inokulierten Zellen lag bei 5 Millionen Zellen, die Vitalität bei 95%.

3.2. Dokumentation des subkutanen Tumorwachstum

Zur Dokumentation des subkutanen Tumorwachstums (Abb. 6) wurden die Tumoren auf dem Rücken der Tiere mit einer Leica R5 fotografiert. Als Filmmaterial diente ein Kodak Ektachrom 64 T Kunstlicht Farbfilm. Dies geschah in einer Äthernarkose, gleichzeitig mit der Messung der Tumordurchmesser, um so die Belastung der Tiere gering zu halten.

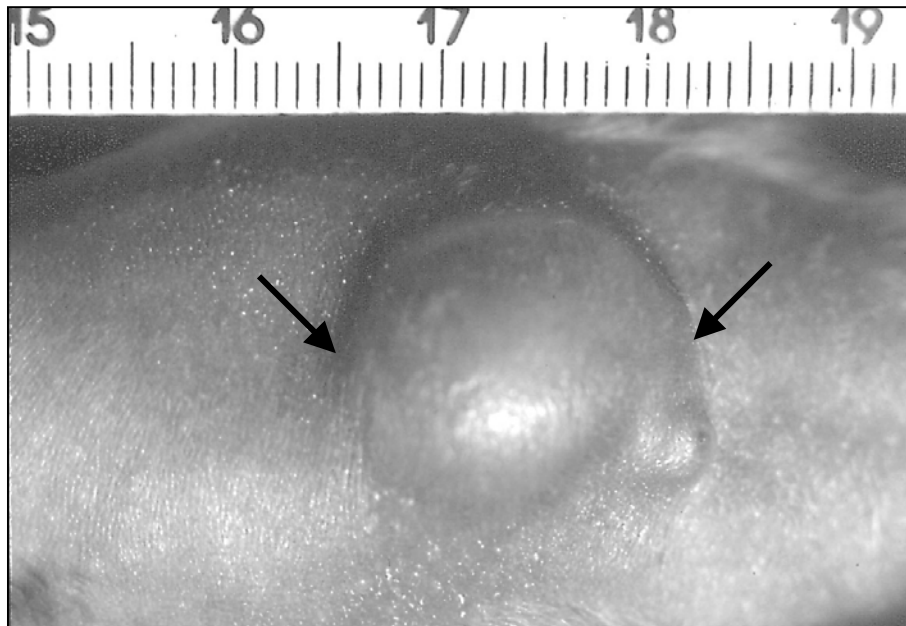


Abbildung 6: A-Mel-3 unter der Rückenhaut des Syrischen Goldhamsters

Das Foto zeigt eine Aufsicht auf die Rückenhaut des Syrischen Goldhamsters. Das subkutan wachsende A-Mel-3 ist deutlich zu erkennen. Die Pfeile markieren den Tumorrund. Ein Intervall auf dem Maßstab entspricht 1mm.

4. Implantation von Verweilkathetern

Zwei Tage vor dem ersten Meßzeitpunkt wurden die Tiere narkotisiert (Nembutal; 50mg/kg KG i.p.) und die rechte Regio jugularis mit der Vena jugularis interna chirurgisch dargestellt. Unter dem Operationsmikroskop wurde ein mit Kochsalz gefüllter, 20 cm langer Polyethylenkatheter (0,28mm ID, 0,61mm OD; SIMS Portex, U.K.) in die rechte Vena jugularis eingeführt und ca. 10 mm bis kurz vor das rechte Herz vorgeschoben. Der Katheter wurde mit Seide (Perma-Handseide 6-0; Ethicon GmbH Norderstedt) an der Vena jugularis fixiert und an das subkutane Gewebe angenäht. Die Ausleitung des Katheters über einen subkutanen Hauttunnel in den Rücken der Tiere gewährleistete einen langfristigen Schutz vor mechanischer Manipulation und Entzündungen. Vor dem Erwachen der Tiere und nach jedem

einzelnen Versuchsvorgang wurden die Katheter am distalen Ende verknotet und an der Rückenhautkammer mit Leukosilk fixiert, wodurch die Tiere an einer Entfernung des Katheters gehindert waren.

5. Wiegen der Tiere

Die Tiere wurden auf einer Kleintierwaage (Mettler, Schweiz) täglich gewogen.

6. Zyklische Peptide zur Antagonisierung der α_v -Integrine

Die in dieser Arbeit eingesetzten zyklischen Peptide

zyklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe(N-methyl)Val); Code: EMD121974 („RGD-Peptid“)

zyklo(Arg- β -Ala-Asp-D-Phe(N-methyl)Val); Code: EMD135981 („RAD-Peptid“)

wurden synthetisiert und charakterisiert durch die Firma Merck KGaA, Darmstadt. Beide Peptide wurden als Trockensubstanz geliefert. Vor Beginn einer Versuchsserie wurden sie in PBS aufgelöst. Die Konzentration betrug dabei 10 mg/ml. Die Lösungen wurden bei Raumtemperatur bis zum Abschluß einer Versuchsserie gelagert.

6.1. Zyklo(Arg-Gly-Asp-D-Phe(N-methyl)Val); Code: EMD121974 („RGD-Peptid“)

Hierbei handelt es sich um den eigentlichen α_v -Integrin Antagonisten. Die Bindungsseite besteht aus den drei Aminosäuren Arginin (Arg), Glycin (Gly) und Aspartat (Asp). Nach den internationalen Abkürzungsregeln für Aminosäuren abgekürzt als RGD. Um Ringformation zu erreichen wurden die Aminosäuren Phenylalanin und Valin durch N-Methylierung als „Rückgrad“ des Peptids eingefügt (Manavalan & Momany, 1980; Ron *et al.* 1992). Dies hat bedeutende Folgen für die biologische Aktivität und Selektivität. Das Peptid wurde vor kurzem als hoch selektiver Antagonist gegen das Integrin $\alpha_v\beta_3$ beschrieben (Dechantsreiter *et al.* 1999) (Abb. 7).

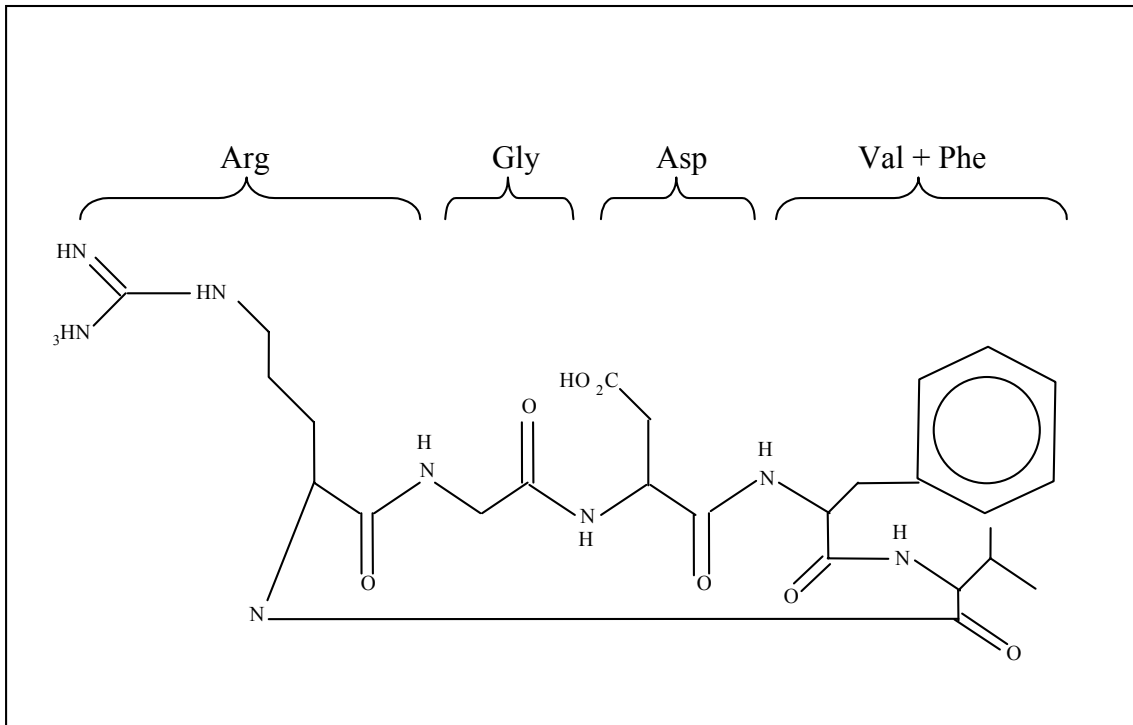


Abbildung 7: Das zyklische RGD-Peptid EMD 121974

Das Bild zeigt das zyklische RGD-Peptid, bestehend aus den drei Aminosäuren Arginin (Arg), Glycin (Gly) und Aspartat (Asp). Die Aminosäuren Phenylalanin (Phe) und Valin (Val) ermöglichen durch N-Methylierung zwischen ihren Amidbindungen den Ringschluß.

6.2. Zyklus(Arg-β-Ala-Asp-D-Phe(N-methyl)Val); Code: EMD135981 („RAD-Peptid“)

Bei diesem Peptid handelt es sich um ein inaktives Kontrollpeptid. Dabei wurde die Aminosäure Glycin gegen β-Alanin ausgetauscht. Diese Veränderung der RGD-Sequenz führt zu einem kompletten Verlust der Aktivität des Peptids (Ali *et al.* 1990).

7. Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Quantifizierung der Tumormikrozirkulation und der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurden folgende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

Plasmamarker: Fluoreszeinisothiozyanat-Dextran (FITC-Dextran; Sigma, Deisenhofen), 500 kD, 0,05-0,1 ml einer 5% Lösung in 0,9% NaCl.

Leukozytenmarker: Rhodamin 6G (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), 0,04 ml einer 0,05% Lösung in 0,9% NaCl.

Die Fluoreszenzmarker wurden in der angegebenen Menge jeweils unmittelbar vor den intravitalmikroskopischen Messungen über den Katheter in der Vena jugularis injiziert. Direkt danach wurden die Katheter mit 0,1 ml 0,9% NaCl nachgespült, um den Totraum zu entleeren.

8. Apparative Ausstattung

Im Folgenden werden die apparativen Einrichtungen beschrieben, die in dieser Studie verwendet wurden. Hierbei handelt es sich um Techniken, die bereits seit vielen Jahren am Institut für Chirurgische Forschung entweder etabliert oder angewendet wurden. Näher wird hier auf spezielle Techniken eingegangen, die im Rahmen dieser Studie erforderlich waren. Für detaillierte Informationen sei auf die Dissertationsarbeiten speziell von Goetz, (1987); Fritsch, (1996) und Sinitsina, (2000) sowie auf Veröffentlichungen aus den Arbeitsgruppen Endrich, Goetz, Nolte und Leunig hingewiesen (Asaishi *et al.* 1981; Endrich *et al.* 1982b; 1988b; Leunig *et al.* 1992b; 1994a; Nolte *et al.* 1997).

8.1. Intravitalmikroskopischer Meßplatz

Bestandteile des modifizierten Intravitalmikroskops (Orthoplan; Leitz, München) waren eine fiberoptische Durchlichtquelle, eine anregende Auflichtquelle, ein Ploemopak Illuminator mit Filterblock, eine Detektionseinheit mit hochempfindlicher Videokamera

und ein Mikroskopiertisch, der in zwei-dimensionalen Richtung (X-Y-Achse) beweglich war. Auf diesem konnte eine speziell angefertigte Untersuchungsplattform, auf der die Tiere fixiert werden konnten, montiert werden (Abb. 8).

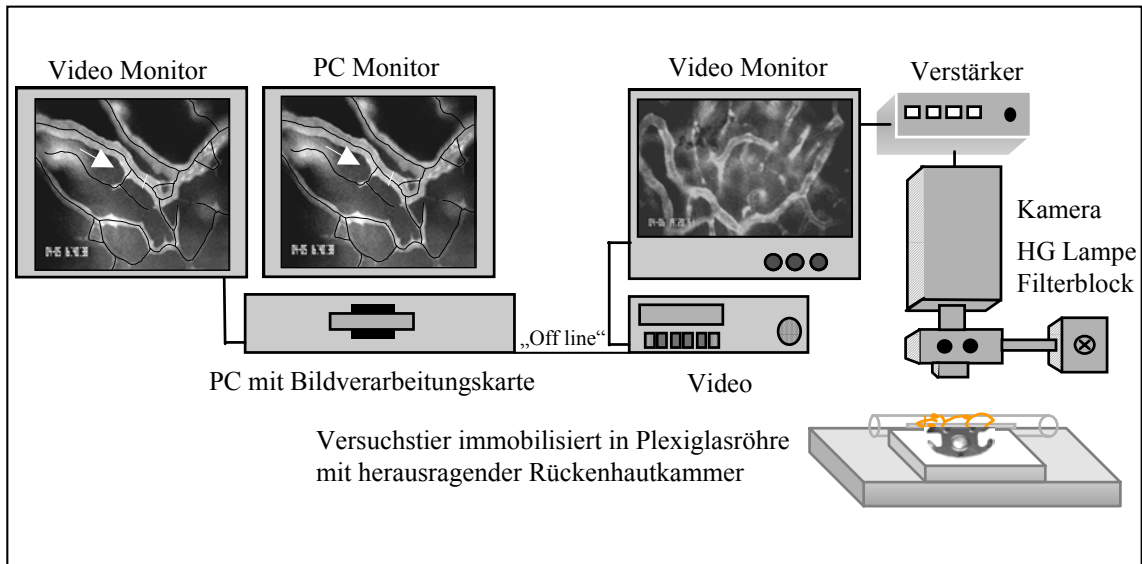


Abbildung 8: Aufbau des intravitalmikroskopischen Meßplatzes

Dargestellt ist der intravitalmikroskopische Meßplatz und die Auswerteeinheit. Auf der Untersuchungsplattform konnte das Tier in der Röhre immobilisiert und bewegt werden. Über die Detektionseinheit werden die Bilder auf dem Monitor dargestellt und gleichzeitig auf Videoband gespeichert. Das Videoband konnte später „Off-Line“ ausgewertet werden.

8.1.1. Vorbereitung und Positionierung der Versuchstiere unter den Meßplatz

Die Versuchstiere wurden zunächst gewogen und dann in wachem Zustand in einer transparenten Plexiglasröhre (Innendurchmesser 5 cm) immobilisiert. Durch einen längs verlaufenden Schlitz in der Röhre ragte die Kammer mit dem daran fixierten Katheter heraus. An die Röhre waren die Tiere - wie eingangs dargestellt- zum Versuchszeitraum bereits adaptiert. Die Röhre mit dem Hamster konnte nun auf einer speziell dafür angefertigten Plattform horizontal fixiert werden (Abb. 8). Dazu wurden die

Schrauben der Rückenhautkammer in die Löcher einer millimetergenauen Schiene eingerastet und die Röhre mit einer Schiebevorrichtung gegen Verrutschen abgesichert. Dadurch war die Rückenhautkammer und damit das darin gelegene Hautareal absolut immobilisiert. Dies ist Voraussetzung für eine exakte Messung aller Parameter. Eine Heizplatte unter der Untersuchungsplattform verhinderte ein Auskühlen der Tiere. Nach Abschluß der Messungen, die ca. 30 min dauerten, wurden die Tiere zurück in den Käfig gesetzt, wo sie wieder freien Zugang zu Wasser und Futter hatten.

8.1.2. Das optische System

Das modifizierte Intravitalmikroskop (Orthoplan; Leitz, München) war getrennt vom Mikroskopiertisch an der Hydraulik eines Bohrmaschinengestells befestigt. Es war aus folgenden Einzelteilen aufgebaut: einem FSA-Tubus-GW, einem Vario-Tubus mit einer stufenlosen Vergrößerungsmöglichkeit von 1 bis 3,2 fach, verschiedenen Objektiven (GW 4x, 28; 10x, n.A. 0,22; 20x, n.A. 0,33; 25x, n.A. 0,60; 32x, n.A. 0,60) und einem Ploemopak Illuminator. Zur Feinfokussierung der jeweiligen Präparationsareale diente ein Mikro-Makroantrieb an dem das gesamte Mikroskop aufgehängt war und so in der vertikalen Achse bewegt werden konnte.

8.1.3. Beleuchtung zur Fluoreszenz-Anregung

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde eine 100 W Quecksilberhochdrucklampe (HBO 100 W, Leitz, Wetzlar) als anregende Lichtquelle in der Epi-Illuminationstechnik benutzt. Bei der Auflichtmikroskopie beleuchtet die Lichtquelle die Fluoreszenzfarbstoffe mit der jeweiligen charakteristischen Wellenlänge. Dadurch werden die Fluoreszenzmarker angeregt und emittieren Lichtphotonen, die durch das optische System des Mikroskops erfaßt werden können.

Um eine konstante Lichtleistung zu produzieren mußte die Lampe 30 min vor Beginn der Versuche eingeschaltet werden. Unmittelbar vor dem Mikroskopieren wurde die Lichtstärke mit einem Photometer (Spectra Physics, San Jose, California) an mehreren

Punkten über der zu beleuchtenden Versuchsfläche (\varnothing ca. 1,5 cm) gemessen. Dies sollte eine gleichmäßig verteilte Beleuchtungsdichte gewährleisten. Bei Unregelmäßigkeiten konnte der ausfallende Strahl der Quecksilberlampe durch Justierung eines sich in der Lampe befindlichen Reflektorspiegels entsprechend eingestellt werden. Bei längerer Versuchsdauer wurden die Kontrollen regelmäßig wiederholt. Um phototoxische Effekte ausschließen zu können, wurde die Beleuchtungsintensität pro Bildaufnahme von 1 mW/cm² nicht überschritten (Steinbauer *et al.* 2000).

8.1.4. Strahlengang und Filterblock

Der Ploemopack Illuminator besteht aus einem Filterblock, den das emittierende Licht der Quecksilberlampe, sowie das remittierende Fluoreszenzlicht vom untersuchten Gewebe passieren mußte (Abb. 8). Als Anregungsfilter diente ein Bandpaßfilter (Leitz, Wetzlar), welcher nur einen schmalen Wellenbereich des Lichtes passieren ließ. Die selektive Fluoreszenzdetektion der Substanzen wurde durch Langpaßfilter (Leitz, Wetzlar) gewährleistet. Da die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe verschiedene Excitations –und Emissionsspektren besitzen, waren die jeweils nötigen Filter in einer drehbaren Platte fixiert. So konnten abwechselnd sowohl die Tumormikrozirkulation als auch die Leukozyten visualisiert werden.

Das Exzitationsspektrum von FITC-Dextran liegt im blauen Bereich mit einem Maximum bei $\lambda=490$ nm und das Emissionsspektrum im grünen Bereich mit einem Maximum bei $\lambda=520$ nm. Daher fand hier ein Leitz I 2/3 Filterblock (Exzitation 450-490 nm, Emission ≥ 515 nm) Anwendung. Rhodamin 6G wird mit einem Maximum bei $\lambda=525$ nm angeregt und fluoresziert im roten Bereich mit einem Maximum bei $\lambda=555$ nm. Hier kam ein Leitz N2 Filterblock (Exzitation 530-560 nm, Emission ≥ 580 nm) zum Einsatz.

Unabhängig davon konnte man die Filterblöcke auch aus dem Strahlengang entfernen, so daß es möglich war, das zu untersuchende Gewebe auch bei normalem Raumlicht oder mit Durchlicht über das Okular des Mikroskops oder die Kamera zu betrachten.

8.1.5. Detektionseinheit

Zur Aufzeichnung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurde eine SIT-Videokamera (C2400-08, Hamamatsu, Herrsching) eingesetzt. Die über die Kamera gewonnenen Bilder konnten direkt on-line auf einem Monitor dargestellt werden. So konnte die Funktionstüchtigkeit der Kamera fortlaufend hinsichtlich Sensitivität, Homogenität und Linearität beurteilt werden. Gleichzeitig wurden die Bilder von einem Videorekorder auf Videoband (Sony, München) aufgezeichnet. Über einen in das Videosignal eingeschalteten Videozeitgenerator (VTG 33; FOR-A-Company Ltd., Japan) wurden Datum und Uhrzeit mit auf das Videoband aufgezeichnet. Ein an das Videogerät angeschlossenes Mikrophon (Sony-ECM 16T, Sony München) erlaubte, wichtige Beobachtungen zeitgleich auf dem Band zu speichern.

8.2. Videomakroskopischer Meßplatz

Parallel zu den intravitalmikroskopischen Observationen wurden die Tumoren in der Rückenhautkammer videomakroskopisch aufgenommen, um daraus die Tumorfläche in der Kammer zu bestimmen. Die Untersuchungsplattform konnte dazu im Ganzen unter das Videomakroskop positioniert werden. Für die Aufnahmen diente ein Leitz Makroskop (Vergrößerungsfaktor 29,6; Leitz, Wetzlar), auf dem eine schwarz-weiss Videokamera (XC-77; Sony, München) befestigt war. Über einen Videoselektor (VCS 50 M, Sony, München) konnte zwischen der Videokamera und der SIT-Kamera umgeschalten werden, so daß das entsprechende Bild mit dem Videorekorder aufgenommen werden konnte.

8.3. Auswerteeinheit

Sämtliche quantitativen Analysen der mikrozirkulatorischen Parameter sowie die Bestimmung der Tumorfläche in der Rückenhautkammer wurden off-line, d.h. nach Beendigung des Versuches durch Abspielen des Videobandes durchgeführt. Hierdurch

konnte der Zeitraum des Versuches verkürzt, und die Belastung für das wache Versuchstier auf ein Minimum reduziert werden. Die Videobänder wurden mit einem Videogerät abgespielt und mit dem Programm Cap-Image 6.01 (Klyscz *et al.* 1997) ausgewertet. Die Verarbeitung der optischen Bilder erfolgte mit einer Bildverarbeitungskarte IP-8/AT (Matrox, Kanada), der ein IBM-kompatibler PC (CCH, Pentium), ein Videomonitor (PVM-1442QM, Sony) und ein Farbbildschirm zugeschaltet wurden. Videogerät und Bildverarbeitung waren über eine RS-232-Schnittstelle verbunden und konnten vollständig über den PC gesteuert werden (Abb. 8).

9. Meßparameter von Tumormikrozirkulation, -Wachstum –und Metastasierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Meßparameter im jeweiligen Modell gemessen oder berechnet.

9.1. Parameter im Rückenhautkammermodell

- Funktionelle Gefäßdichte (fGD) in cm/cm^2
- Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten (V_{RBC}) in mm/s
- Gefäßdurchmesser (d) in μm
- Leukozyten-Endothelzell-Interaktion
 - Rollende Leukozyten als Zellen/min
 - Adhärente Leukozyten als Zellen/ mm^2
- Tumorfläche in der Rückenhautkammer (A) in mm^2

Berechnete Parameter:

- Volumenfluß (Q) in $\mu\text{l}/\text{s}$

9.1.1. Funktionelle Gefäßdichte

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie kann die Intensität des Gefäßwachstums im Gewebe durch Messung der funktionellen Gefäßdichte quantifiziert werden (Schmid-Schoenbein *et al.* 1977; Nolte *et al.* 1995). Man versteht darunter die Länge der perfundierten Gefäße pro Beobachtungsfläche (cm/cm^2). Sie stellt einen wichtigen Parameter der Tumorangiogenese dar (Dellian *et al.* 1996b) (Abb. 9). Zur quantitativen Erfassung wurden die auf dem Monitor durch FITC-Dextran visualisierten Gefäße im off-line Modus nachgezeichnet, um so die Gesamtlänge der Gefäße zu messen (Klyscz *et al.* 1997). Durch digitale Bildanalyse wurde die funktionelle Gefäßdichte aus der zuvor bestimmten Gesamtlänge der markierten Gefäße, dividiert durch das definierte Beobachtungsfeld (cm/cm^2), berechnet.

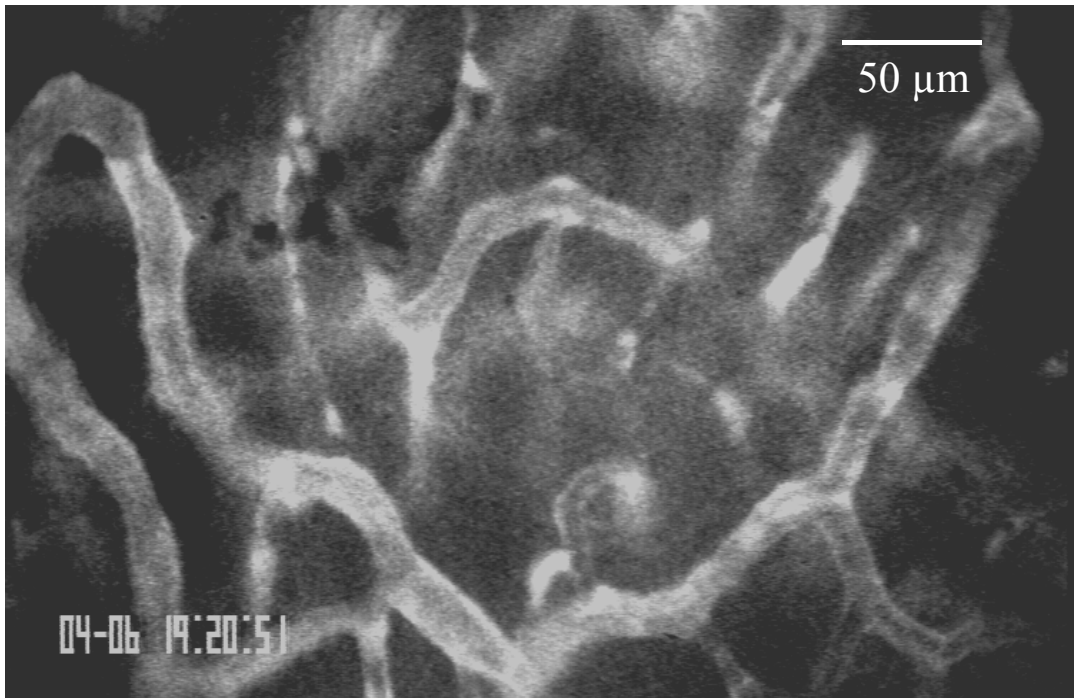


Abbildung 9: Tumormikrozirkulation im A-Mel 3

Das Bild zeigt die Tumormikrozirkulation, wie sie sich im Intravitalmikroskop nach Gabe des Plasmamarkers FITC-Dextran darstellt. Man erkennt die typische Heterogenität der Tumorgefäße. Charakteristisch sind die Gefäßschleifen, Anastomosen und Kalibersprünge.

9.1.2. Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten

Die Messung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit erfolgte mit der Line-Shift-Diagramm-Methode (Klyszcz *et al.* 1997). Mit der Computermaus wird eine gerade oder beliebig gekrümmte Meßlinie entlang des Gefäßes gezeichnet. Danach wird eine Bildsequenz von 10 Sekunden Dauer ausgewertet. Während der Messung werden für jedes Halbbild die Grauwertdaten entlang der Meßlinie erfaßt und in einem Bildspeicher als vertikale Linien nebeneinander geschrieben. Nach Ablauf der Meßsequenz wird der Bildspeicher mit den aneinandergereihten Meßlinien angezeigt. Durch Markierung dieser Meßlinien im Line-Shift-Diagramm wird automatisch aus deren Steigung die Geschwindigkeit berechnet.

9.1.3. Gefäßdurchmesser

Die Gefäßdurchmesser wurden mittels Cap-Image (Klyscz *et al.* 1997) gemessen. Dazu ist die digitale Übertragung der Analogbilder der zu messenden Gefäße auf einen Farbmonitor erforderlich. Die Bestimmung des Durchmessers der Tumorgefäße erfolgte mit der manuellen Methode. Hierzu wird durch Anklicken der zwei Randpunkte (jeweils in der Mitte der Gefäßwand) die Durchmesserstrecke direkt markiert und exakt senkrecht zum Verlauf des Tumorgefäßes gelegt. Auf diese Weise wurden drei Einzelwerte pro Gefäß ermittelt und daraus der Mittelwert berechnet.

9.1.4. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

In jedem untersuchten Gefäßsegment wurde die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion 30 Sekunden beobachtet. Entsprechend ihrer Interaktion mit dem mikrovaskulären Endothel wurden die Leukozyten eingeteilt in

- Rollende Leukozyten: Im Randstrom fließende Zellen, die temporär mit der Gefäßwand interagieren und dabei wenigstens eine um 50% langsamere Geschwindigkeit haben als der zentrale Blutfluß. Die Rollenden Leukozyten sind als Zellen angegeben, die pro Minute ein Gefäßsegment passieren (Zellen/min).
- Adhärente Leukozyten: Zellen, die sich während dem Zeitintervall von 30 Sekunden nicht vom Gefäßendothel lösen. Sie sind angegeben als Zellen/mm² Gefäßwand, berechnet aus Gefäßdurchmesser und Gefäßlänge (100-150 µm) (Atherton & Born, 1972; Dellian *et al.* 1996b).

9.1.5. Tumorfläche in der Rückenhautkammer

Die Fläche, die der Tumor in der Rückenhautkammer einnahm, konnte mit Cap-Image planimetrisch bestimmt werden. Dazu wurden die videomakroskopisch gewonnenen Bilder der Tumoren in der Rückenhautkammer auf einem Farbmonitor dargestellt. Mit dem Mauszeiger kann die Fläche umrundet und anschließend berechnet werden (mm²).

9.1.6. Volumenfluß

Der Volumenfluß in einer Röhre wird üblicherweise bestimmt durch Multiplikation von Fließgeschwindigkeit und Röhrenquerschnitt. Da die Geschwindigkeit mit der dargestellten LSD-Methode im Zentralstrom des Gefäßes gemessen wird, findet aufgrund des Geschwindigkeitsprofils in Gefäßen (höhere Geschwindigkeit im Zentralstrom im Vergleich zur Randgeschwindigkeit) eine Überschätzung der gesamten Fließgeschwindigkeit im Gefäß statt (Baker & Wayland, 1974; Lipowsky & Zweifach, 1978). Der von Baker und Wyland eingeführte Proportionalitätsfaktor von 1,6 ist ein Korrekturfaktor und berücksichtigt diese Diskrepanz v.a. in Gefäßen mit einem Durchmesser zwischen 10 und 60 µm. In der Volumenflußberechnung der vorliegenden Experimente wurde der Faktor 1,6 gewählt, da die Mehrzahl der im Verlauf dieser Experimente ermittelten Gefäßdurchmesser zwischen 10 und 40 µm lagen. Der Volumenfluß berechnete sich damit aus der Formel:

$$Q = (\text{VRBC} / 1,6) * (d/2)^2 * 3,14$$

9.2. Parameter am subkutanen Tumormodell

- Tumordurchmesser (d) in cm
- Erfassen von Metastasen

Berechnete Parameter:

- Tumolvolumen (V) in cm³
- Wachstumsverzögerung

9.2.1. Tumordurchmesser und Berechnung des Tumolvolumens

Die Messungen wurden in Äthernarkose durchgeführt. Mit einem Greifzirkel wurden der längste (l) und der kürzeste (b) horizontale Durchmesser und die Höhe (h) der halbellipsoidförmigen Tumoren gemessen. Daraus wurde das Tumolvolumen nach der von Tomayko und Reynolds beschriebenen Formel

$$V = l * b * h * 0,873$$

berechnet (Tomayko & Reynolds, 1989). Die Konstante $c = 0,873$ wurde durch Weiss und Mitarbeiter (Weiss *et al.* 1990) für das amelanotische Hamstermelanom bestimmt. Dazu wurden die Durchmesser von 19 Tumoren unterschiedlicher Größe vor oder nach Therapie gemessen. Unmittelbar danach wurden die Tumoren entnommen und gewogen. Das spezifische Gewicht der Tumoren wurde mit 1 g/cm^3 angenommen und das aus den Durchmessern berechnete Volumen mit dem aus dem Gewicht berechneten Volumen gleichgesetzt. Daraus ergab sich der Wert für die Konstante c . Das aus den Durchmessern berechnete Volumen korrelierte sehr gut mit dem aus dem Gewicht berechneten ($r > 0,98$).

9.2.2. Erfassung von Metastasen

Ein Einfluß der Therapie auf die Metastasierung des Tumors ist denkbar. Um dies zu erfassen, wurde die Metastasierung der Tumoren mit beobachtet und dokumentiert. Die in die Rückenhaut implantierten Tumoren metastasieren zunächst in die regionalen Lymphknotenstationen von Axilla und Regio femoralis und sind dort der Palpation sehr gut zugänglich. Diese Lymphknotengruppen wurden palpatorisch beurteilt. Sobald in einer dieser Regionen ein vergrößerter Lymphknoten zu tasten war, wurde das Versuchstier als Lymphknoten-Positiv eingestuft.

9.2.3. Wachstumsverzögerung

Um eine mögliche Wachstumsverzögerung unter Therapie angeben zu können, wurden für die einzelnen Tumoren Wachstumszeiten in Tagen berechnet, die diese bis zum Erreichen mehrerer definierter Volumina benötigten. Dies geschah mit einer Näherung durch logarithmische Interpolation zwischen den gemessenen Werten (Dellian, 1993a).

10. Vorversuche

Vor Durchführung der eigentlichen Experimente wurden Vorversuche hinsichtlich der Pharmakokinetik des Peptids sowie Versuche zur Dosisfindung durchgeführt. Diese Vorversuche dienten der Bestimmung pharmakologischer Parameter, sowie der Ermittlung einer geeigneten Dosis und einem geeigneten Zeitintervall für die Applikation des Peptids.

10.1. Vorversuch zur Pharmakokinetik des RGD-Peptids

Es wurden vier Syrische Goldhamster (45-55g) verwendet. Vor dem Versuch wurden den Tieren arterielle Katheter für die Blutentnahme in die A. carotis interna gelegt. Um einen „Nullwert“ zu erhalten, wurde die erste Blutentnahme vor Peptidgabe

durchgeführt Zwei der Tiere wurden zusätzlich venöse Katheter in die V. jugularis interna implantiert, um das Peptid intravenös verabreichen zu können. Das Peptid wurde in einer Dosis von 15mg/kg KG zum Zeitpunkt Null intravenös oder intraperitoneal verabreicht. Nach 1, 3, 10, 20, 40 und 60 Minuten, sowie nach 6 und 24 Stunden wurde den Tieren arteriell ca. 0,05–0,1 ml Blut entnommen. Die Proben wurden direkt nach Entnahme zentrifugiert und der Hämatokrit bestimmt. Die Konzentration des Peptids zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde im Plasma mittels HPLC von Frau Dr. J. Haunschild (E. Merck, Grafing) bestimmt.

10.2. Vorversuch zur Anwendung des Peptids

Um eine geeignete Dosis und ein geeignetes Zeitintervall für die Applikation des Peptids zu ermitteln, wurden 12 Syrischen Goldhamster, vier Tiere in drei Gruppen, die transparente Rückenhautkammer implantiert. Meßparameter war die unter 9.1.5. beschriebene Tumorfläche in der Kammer. Die Dosierung des Peptids richtete sich bei diesem Erstversuch zunächst nach Angaben aus der Literatur, in denen Versuche mit RGD-Peptiden durchgeführt wurden (Imura *et al.* 1992; Luna *et al.* 1996; Hammes *et al.* 1996). Die Dosis betrug 30mg/kg KG.

Wie aus Abbildung 10 ersichtlich, wurden folgende drei Gruppen (n = 4) gebildet:

1. Scheinbehandlung mit Kontrollpeptid (RAD) im Abstand von 12h; i.p.
2. RGD-Peptid im Abstand von 12h; i.p.
3. RGD-Peptid im Abstand von 48h; i.p.

Das experimentelle Protokoll gestaltete sich folgendermaßen: Zunächst wurde die Rückenhautkammer präpariert. Nach zwei Tagen wurden den Tieren die Tumorzellen in die Kammer implantiert und die Behandlung begann einen Tag nach Tumorzellimplantation. An den Tagen 3, 4, 6, 8 und 10 wurden die Tumoren in der Kammer mit dem Videomakroskop aufgenommen, um dann „off-line“ die Tumorfläche bestimmen zu können.

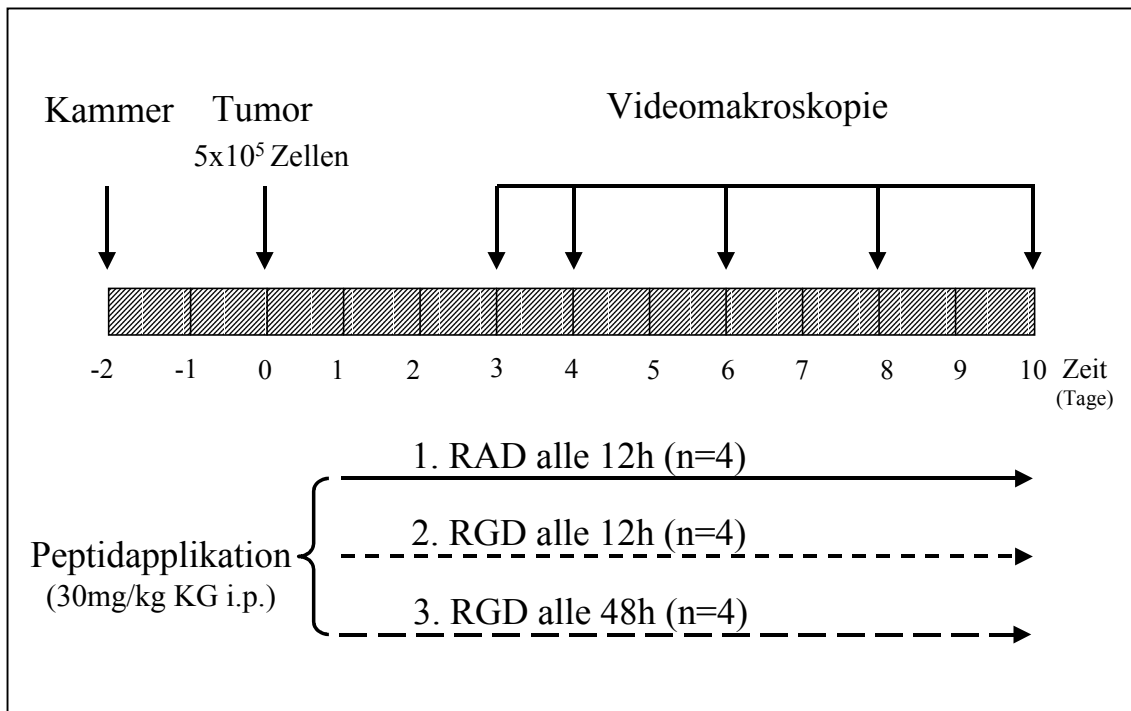


Abbildung 10: Experimentelles Protokoll zur Dosisfindung

Zwei Tage nach Rückenhautkammerimplantation wurden die Tumorzellen implantiert und einen Tag danach die Behandlung begonnen. Die erste Gruppe wurde mit einem Kontrollpeptid (RAD-Peptid) alle 12h scheinbehandelt. Die 2. Gruppe bekam das RGD-Peptid im Abstand von 12h, die 3. Gruppe im Abstand von 48h i.p. An den Tagen 3, 4, 6, 8 und 10 wurde videomakroskopiert.

11. Versuchsprotokolle und Versuchsablauf

11.1. Versuchsprotokoll zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation unter Peptidapplikation

Aufgrund von Messungen in Vorversuchen wurde für diese Versuchreihe folgendes experimentelles Vorgehen gewählt (Abb. 11): Zwei Tage nach Präparation der transparenten Rückenhautkammer wurden die Tumorzellen implantiert (Tag 0). Genau 24h später wurde mit der Behandlung begonnen. Dabei wurde das jeweilige Peptid im

Abstand von 12h über 13 Tage in einer Dosierung von 30mg/kg KG i.p. verabreicht. Parallel dazu wurden das Gewicht der Tiere kontrolliert, die Photodokumentation mittels des Photomakroskops und die Beurteilung der Präparation unter dem Intravitalmikroskop durchgeführt.

Dem dargestellten Schema in Abbildung 11 entsprechend, wurde einen Tag vor den intravitalmikroskopischen Untersuchungen der venöse Katheter implantiert und an den Tagen 3, 5, 9 und 13 am wachen Tier videomakroskopisch die Tumorgroße in der Kammer und intravitalmikroskopisch die Tumormikrozirkulation dokumentiert.

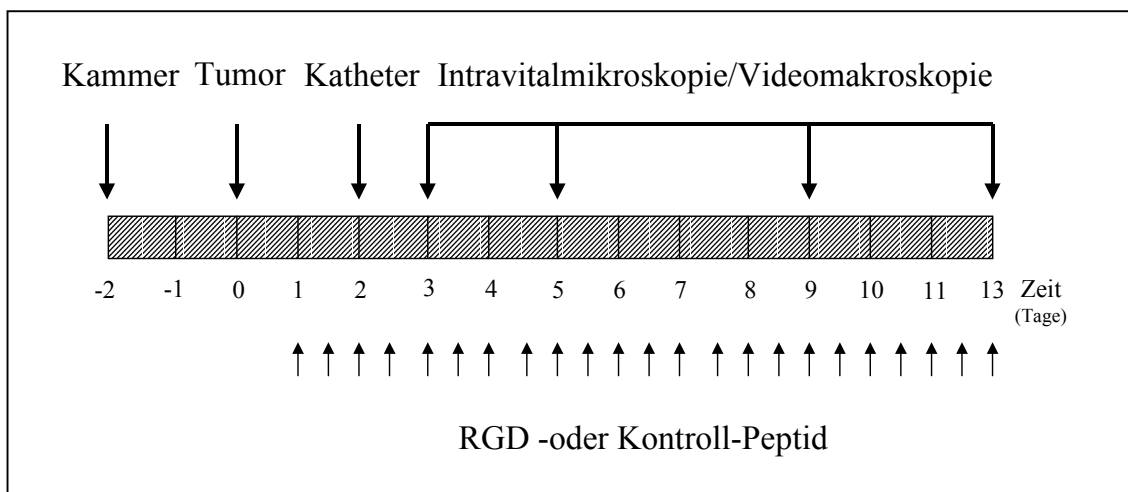


Abbildung 11: Experimentelles Protokoll zur Analyse der Tumormikrozirkulation

Mittels Intravital- und Videomakroskopie wurde an den Tagen 3, 5, 9 und 13 die Tumormikrozirkulation und die Größe des Tumors in der Kammer dokumentiert. Die Behandlung mit dem jeweiligen Peptid erfolgte ab dem ersten Tag nach Tumorzellimplantation im zwölfstündigen Abstand mit 30mg/kg KG i.p.

11.1.1. Ablauf des Akutversuches zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation

Zunächst war es nötig, vor jedem Versuch videomakroskopisch und videomikroskopisch einen Mikrometer-Eichmeßstab aufzunehmen. Das Mikrometer (Leitz, München) wurde hierbei nacheinander so aufgezeichnet, daß es sich horizontal

und vertikal auf dem Bildschirm darstellte. Hierdurch konnten frühzeitig geometrische Fehler entdeckt werden, die elektronisch oder durch mögliche Fehlstellungen der optischen Achse zwischen Mikroskop und Videokamera verursacht wurden. Außerdem diente die Aufnahme des Mikrometers zur Kalibrierung der späteren Auswertung der erfaßten Aufzeichnungen.

Nach der Entnahme aus dem Käfig wurden die Tiere wie Eingangs beschrieben in der Plexiglasröhre immobilisiert, so daß nur noch die Hautkammer mit den aufgenähten Kathetern aus dem längs verlaufenden Schlitz der Röhre ragte (siehe 8.1.1.). Die Röhren mit den darin verweilenden Tieren wurden auf einem eigens dafür angefertigten Plexiglastisch fixiert. Dieser Tisch wurde zunächst unter dem Videomakroskop plziert, um den Tumor in der Kammer aufzunehmen. Anschließend wurde der Plexiglastisch unter dem Intravitalmikroskop positioniert. Nach Verabreichung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte zunächst eine Übersichtsaufnahme mit dem 4x Objektiv. Daraufhin wurden mindesten drei bis fünf Areale im Tumor mit dem 20x Objektiv jeweils für 30 Sekunden mit dem FITC-Dextran -und Rodamin 6G Filterblock auf Video aufgenommen. Dies waren Bereiche aus der Tumorperipherie, dem Tumorzentrum und dem Bereich zwischen Tumorperipherie und Tumorzentrum.

11.2. Versuchsprotokoll zur quantitativen Analyse des subkutanen Tumorwachstums und der Metastasierung

Für die Beobachtung des Tumorwachstums und der Metastasierung wurden die Tumoren einen Tag nach Implantation bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes mit dem jeweiligen Peptid behandelt (Abb. 12). Ab dem 5. Tag nach Tumorzellimplantation wurden zweitägig der Durchmesser der Tumoren wie unter 9.2.1. beschrieben, bestimmt und photographisch dokumentiert. Weiterhin wurden Beginn und Ausmaß der Metastasierung und das Gewicht der Tiere protokolliert. Am 17. Tag wurden, nach den letzten Messungen, die Tiere durch eine Überdosis Nembutal eingeschläfert und die Tumoren und Lymphknoten asserviert.

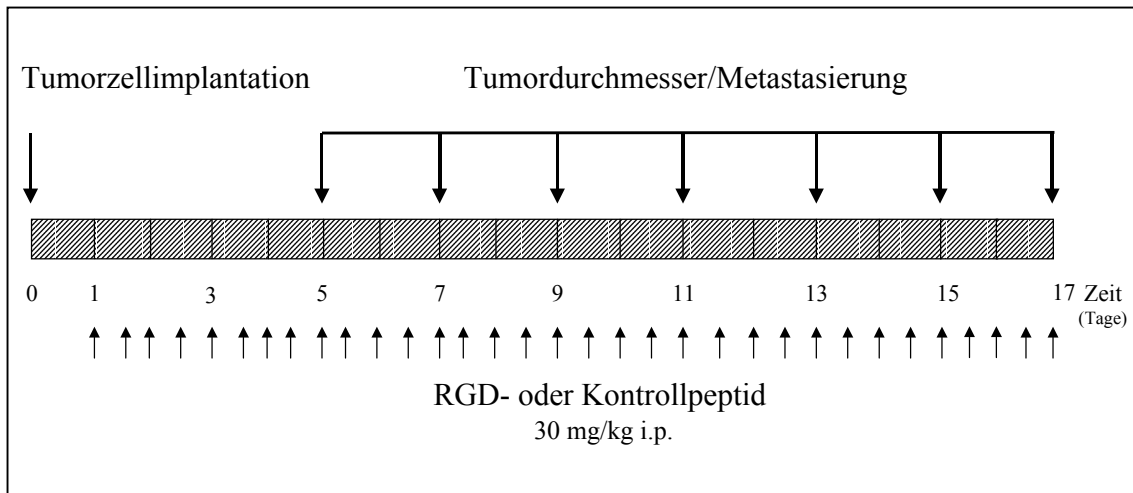


Abbildung 12: Experimentelles Protokoll zur Analyse des Tumorwachstums und der Metastasierung

Graphisch dargestellt ist das zeitliche Vorgehen zur Beobachtung des Tumorwachstums und der Metastasierung.

12. Versuchsgruppen

Gleichermaßen für die intravitalmikroskopischen als auch für die Untersuchungen zu Tumorwachstum und Metastasierung wurde bei der Gruppenbildung wie folgt vorgegangen: Einen Tag nach Tumorzellimplantation wurden die Tiere randomisiert einer der beiden folgenden Gruppen zugeteilt:

Versuchsgruppe I: Behandlung mit dem RGD-Peptid (n = 6)

Versuchsgruppe II: Behandlung mit dem RAD-Peptid (Kontrollpeptid) (n = 6)

Die Behandlung beider Gruppen erfolgte stets 24h nach Implantation der Tumorzellen mit einer Dosierung des jeweiligen Peptids von 30mg/kg KG i.p. im Abstand von 12h.

13. Statistische Bearbeitung und Darstellung der Ergebnisse

Wie bereit erwähnt wurden bei den intravitalmikroskopischen Untersuchungen an jedem Versuchstag je Tumor mindestens drei bis fünf Areale (ROI's) untersucht. In jedem ROI wurde in verschiedenen Gefäßen die Erythrozytenfließgeschwindigkeit, der Gefäßdurchmesser, die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und die funktionelle Gefäßdichte bestimmt und daraus der Median des ROI berechnet. Aus diesen Werten der ROI's wurden die Mediane je Tumor und Tag berechnet und als Boxplots für jeden Versuchstag dargestellt.

Bei einem Boxplot kennzeichnet der mittlere Querstrich den Median. Oberhalb und unterhalb dieses Meßwertes liegen jeweils 50% aller Einzelmessungen. Um den Median wird als „Box“ das obere und untere Quartil eingezeichnet. Damit sind innerhalb dieses Interquartil-Abstandes 50% der Meßwerte enthalten. Jeweils 25% der Meßwerte liegen oberhalb und unterhalb diese Kastens und sind durch vertikale Striche gekennzeichnet. Sie wurden jeweils bis zum äußersten, d.h. dem größten und kleinsten Meßwert verlängert (Sachs, 1984).

Im Gegensatz zur klassischen Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung hat dieses Verfahren den Vorteil, daß auf einen Blick das Ausmaß der Streuung und die Schiefe der Verteilung abgelesen werden können. D.h. ist der Median in der Mitte der „Box“ lokalisiert, so ist die Verteilung im Zentrum symmetrisch, ist er jedoch in Nähe der Interquartillinien lokalisiert, so ist die Verteilung schief. Solch schiefe Verteilungen sind für mikrozirkulatorische Beobachtungen bei den hier verwendeten Tumoren bekannt (Hammersen *et al.* 1985; Goetz, 1987; Dellian, 1993c). Die Darstellung als Boxplots verdeutlicht so anschaulich die Heterogenität und Dynamik der Tumormikrozirkulation.

Bei der zusätzlichen Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurde wie bei der Ermittlung der Mediane vorgegangen. Die Mittelwerte wurden noch weiter zusammengefaßt, so daß der neue Mittelwert die beiden Gesamtgruppen am jeweiligen Versuchstag darstellt. Diese Werte sind mit Standardabweichung in den Tabellen zwei bis sieben wiedergegeben.

Die Ergebnisse wurden statistisch mit nichtparametrischen Rangtests verglichen. Der statistische Vergleich der Ergebnisse zwischen den einzelnen Gruppen (RGD-Gruppe

vs. Kontrollgruppe) erfolgte mit dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney. Der Vergleich der einzelnen Parameter innerhalb einer Gruppe über den Meßzeitraum erfolgte mit dem Test von Kruskal und Wallis und der anschließende paarweise Vergleich mit der Methode nach Dunn (Sachs, 1984).

Die Ergebnisse der Wachstumsmessungen wurden gruppenweise zu Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts ($MW \pm SEM$) des Tumolvolumens zu den verschiedenen Meßzeitpunkten zusammengefaßt. Die Tumolvolumina der beiden Gruppen wurden zu jedem Meßzeitpunkt mit dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney verglichen. Für die einzelnen Tumoren wurden Wachstumszeiten in Tagen berechnet, die diese bis zum Erreichen mehrerer definierter Volumina benötigten. Dies geschah mit einer Näherung durch logarithmische Interpolation zwischen den gemessenen Werten.

Der Effekt auf die Metastasierung wurde mit dem Verfahren von Kaplan und Meier verglichen (Kaplan & Meier, 1958). Der statistische Vergleich der Ergebnisse zwischen den Gruppen wurde mit dem F-Test von Cox (Lee, 1975 und 1980) und nicht wie sonst üblich mit dem Log-Rank-Test durchgeführt. Lee, Desu und Gehan (1975) zeigten, daß der F-Test von Cox gegenüber dem Log-Rank-Test besser geeignet ist, wenn der Stichprobenumfang klein ist ($n < 50$) und keine zensierten Beobachtungen vorhanden sind. Diese Berechnungen erfolgten mit dem Programm Statistica (StatSoft Inc, 1997, Tulsa, OK).

Alle Berechnungen, außer der Metastasierung, wurden mit dem Computerprogramm SigmaStat durchgeführt (SigmaStat 2.0; Jandel Corporation 1995). Die Signifikanzniveaus sind durch ein ($p < 0,05$) gekennzeichnet.

C. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der Vorversuche

Das hier verwendete zyklische RGD-Peptid wurde in den Untersuchungen in dieser Form erstmalig *in vivo* am Syrischen Goldhamster angewendet. Daher mußten zunächst wie im Methodikteil Kapitel 10 beschrieben, Vorversuche hinsichtlich pharmakologischer Eigenschaften und Anwendungsart durchgeführt werden.

1.2. Pharmakokinetik des RGD-Peptids

Wie unter 10.1. im Methodikteil ausführlich dargestellt, wurde das Peptid sowohl intravenös als auch intraperitoneal verabreicht und anschließend seine Konzentration im arteriellen Blut der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dabei ergaben sich die folgenden pharmakokinetischen Daten.

1.2.1. Pharmakokinetik des RGD-Peptids nach i.v. Applikation

In Abbildung 13 ist das Verhalten des RGD-Peptids nach intravenöser Gabe dargestellt. Die maximale Konzentration von 22 µg/ml ist nach zwei Minuten erreicht. Kurz danach fällt die Konzentration im Plasma steil ab. Bis sechs Stunden nach intravenöser Verabreichung des Peptids ließen sich noch Spuren desselben nachweisen. Danach war das Peptid soweit aus dem Plasma entfernt, daß keine Bestimmung mehr möglich war. Die Fläche unter der Kurve (AUC) ergibt sich aus der gemessenen Plasmakonzentration, aufgetragen gegen die Zeit (Fichtel *et al.* 1996). Dabei ist die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve proportional zu der Menge des Arzneistoffes, der ins systemische Blut gelangt. Die hier gemessene AUC betrug 3,5 µg/ml * h. Die Halbwertszeit 10 Minuten.

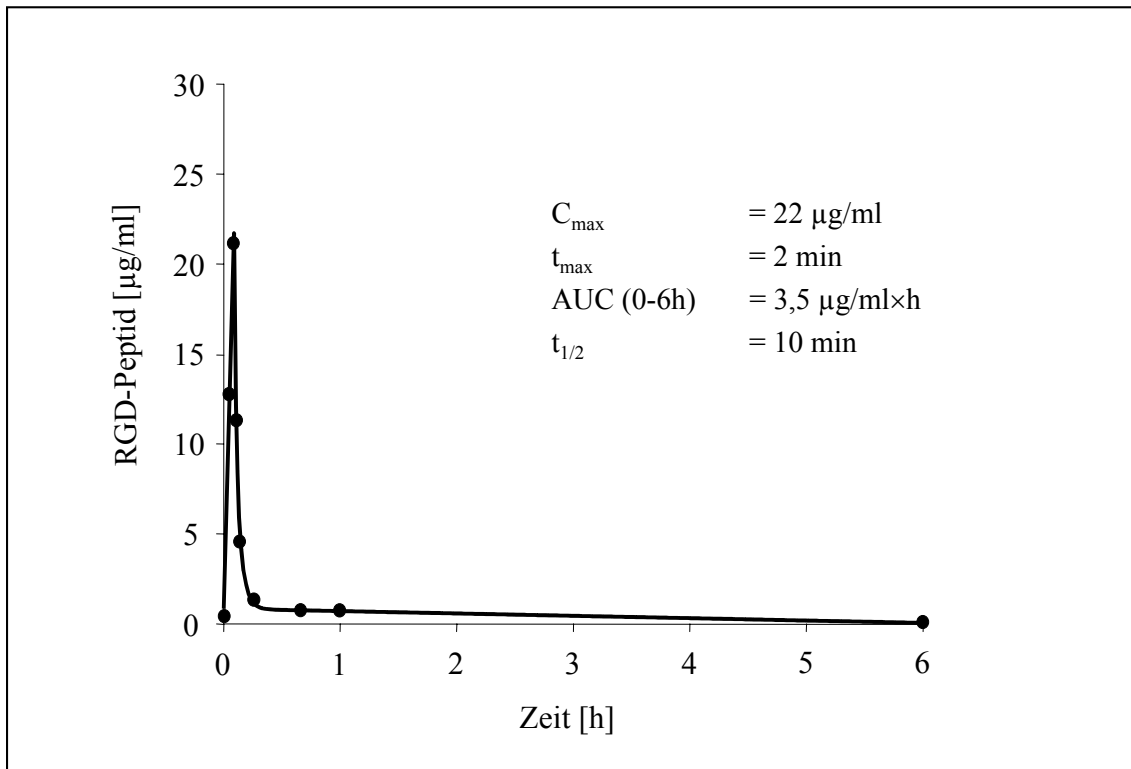


Abbildung 13 Plasmakinetik des RGD-Peptids nach i.v. Applikation

Die Kurve zeigt den Konzentrationsverlauf des RGD-Peptids im Blutplasma nach intravenöser Gabe. Nach mehr als 6 Stunden ließ sich kein Peptid mehr nachweisen.

1.2.2. Pharmakokinetik des RGD-Peptids nach i.p. Applikation

In Abbildung 14 ist das Verhalten des RGD-Peptids im Plasma nach intraperitonealer Gabe dargestellt. Wie es für nicht-intravenöse Injektionen charakteristisch ist, ist die maximale Wirkstoff-Konzentration geringer und wird auch erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht, als nach i.v. Gabe (Fichtel *et al.* 1996). C_{max} beträgt hier 3,4 µg/ml und wird nach 15 Minuten erreicht. Demgegenüber ist die Fläche unter der Kurve mit 4,1 µg/ml * h bei i.p. Gabe größer. Die Halbwertszeit des RGD-Peptids im Plasma ist mit 47 Minuten deutlich länger als nach intravenöser Applikation.

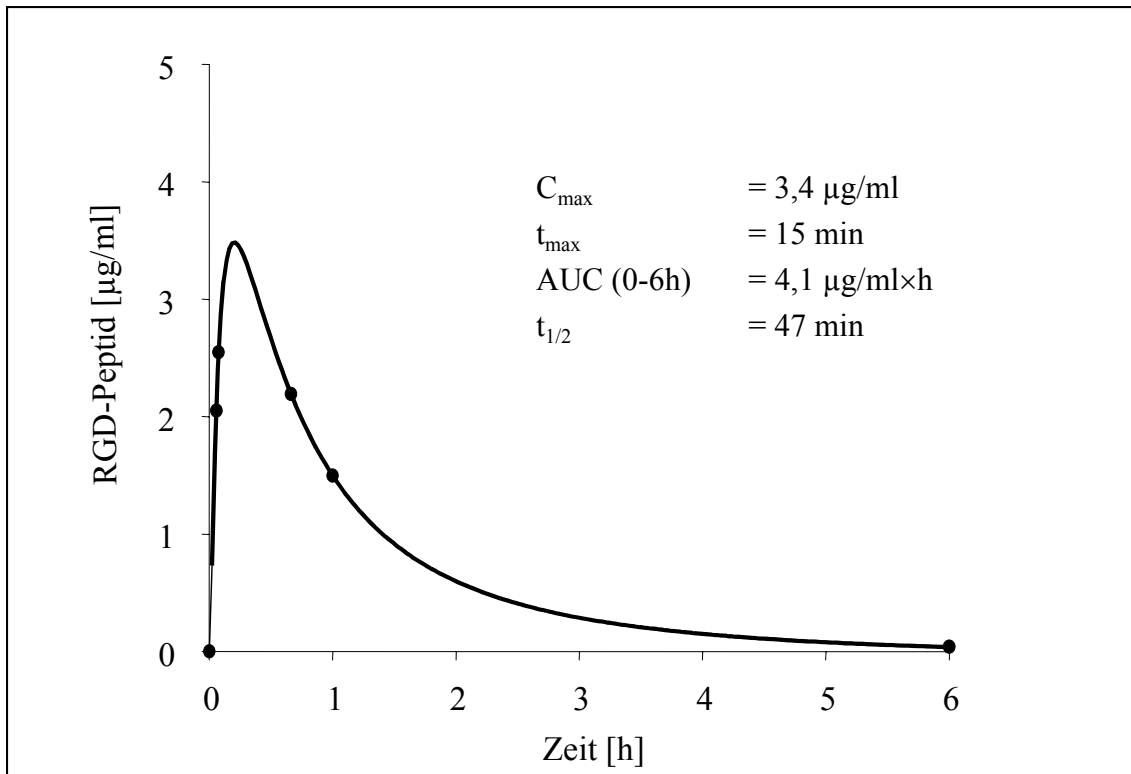


Abbildung 14: Plasmakinetik des RGD-Peptids nach i.p. Applikation

Die Kurve zeigt den Konzentrationsverlauf des RGD-Peptids im Blutplasma nach intraperitonealer Gabe. Nach mehr als 6 Stunden ließ sich kein Peptid mehr nachweisen.

1.3. Dosisfindung zur Anwendung des RGD-Peptids

Wie in 10.2. im Methodikteil dargestellt, ging es bei den Versuchen zur Dosisfindung darum, ein geeignetes Zeitintervall für die Verabreichung des Peptids zu ermitteln und herauszufinden, welchen Effekt die veranschlagte Dosierung des Peptids auf das Tumorwachstum in der Kammer hat. In Abbildung 15 ist zu sehen, daß bereits am ersten Meßzeitpunkt, am Tag drei nach Tumorzellimplantation, bzw. zwei Tage nach Behandlungsbeginn, die Flächen des A-Mel-3 in der Kammer unterschiedlich groß sind. Im weiteren Verlauf nimmt das Wachstum der Tumoren der Kontrollgruppe deutlich zu. Die mit dem RGD-Peptid behandelten Tumoren zeigen in beiden Gruppen ein

langsamerer Wachstum. Dabei ist zu erkennen, daß bei 12 stündiger Verabreichung des Peptids ein tendentiell langsamerer Wachstum zu beobachten ist.

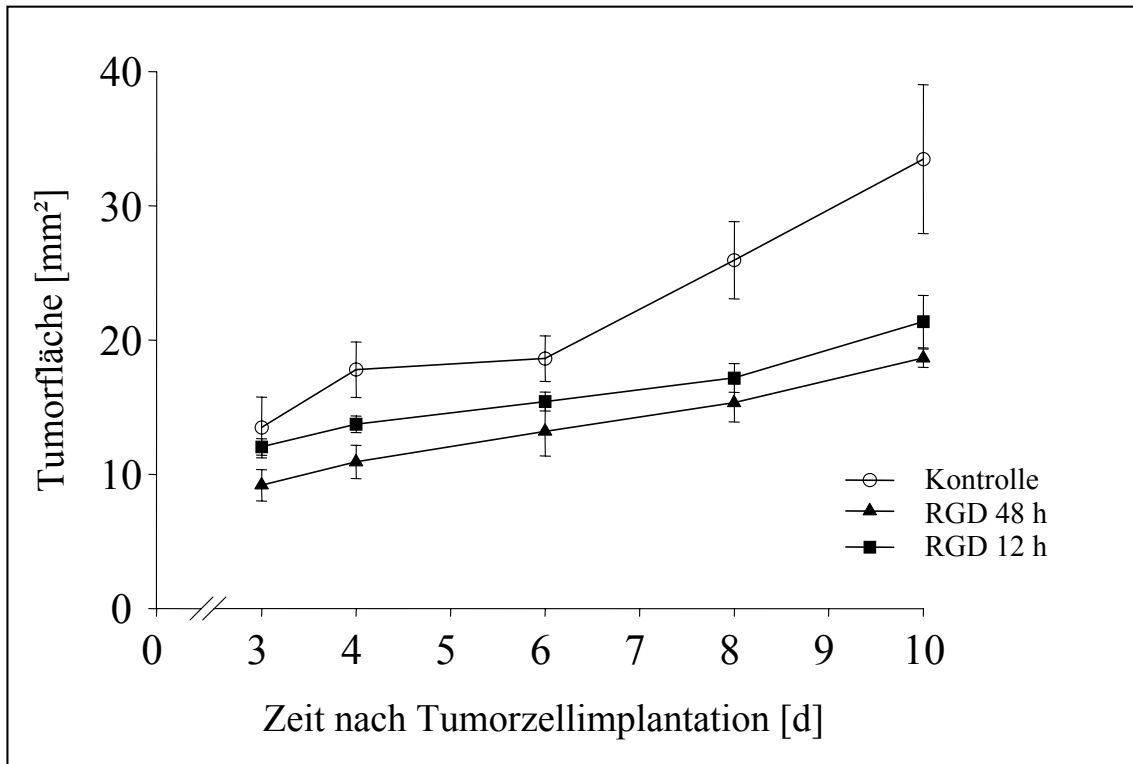


Abbildung 15: Tumorwachstum der Vorversuche

Angegeben ist die Tumorfläche in der Rückenhautkammer der 3 Gruppen über den Zeitraum von 10 Tagen, ab Tag 3 nach Tumorzellimplantation. Eingetragen sind Mittelwert plus/minus dem Standardfehler des Mittelwertes für die scheinbehandelte Kontrollgruppe, und die mit dem Peptidantagonisten (30mg/kg) alle 48 Stunden bzw. alle 12 Stunden behandelten Tiere. Die Behandlung mit dem jeweiligen Peptid erfolgte ab dem ersten Tag nach Tumorzellimplantation. Aufgrund der Anzahl von $n = 4$ pro Gruppe wurde auf eine statistische Wertung verzichtet.

1.4. Zusammenfassung der Vorversuche

Die Ergebnisse der Plasmakinetik des RGD-Peptids zeigten, daß bei intraperitonealer Verabreichung des Peptids mit einer längeren Halbwertszeit und einer größeren AUC zu rechnen ist. Damit ist anzunehmen, daß bei dieser Applikation die Bioverfügbarkeit des Peptids länger ist, als bei intravenöser Gabe (Fichtel *et al.* 1996). Eine 12 stündige Applikation des Antagonisten schien ebenfalls mit einem stärkeren Effekt auf das Tumorwachstum einher zu gehen. Daher wurde für alle weiteren Versuche das Peptid intraperitoneal in einer Dosierung von 30 mg/kg KG alle 12h verabreicht.

2. Ergebnisse der Untersuchungen in der transparenten Rückenhautkammer

2.1. Funktionelle Gefäßdichte

Die funktionelle Gefäßdichte ist definiert als Gesamtlänge der Erythrozyten perfundierten Blutgefäße, bezogen auf das Beobachtungsareal. Damit ist sie ein wesentlicher Parameter für die Aktivität der Tumorangio-genese (Dellian *et al.* 1996b). Die beiden Bilder in Abbildung 16 zeigen intravitalmikroskopische Aufnahmen der Tumormikrozirkulation des A-Mel-3, drei Tage nach Tumorzellimplantation. Nach Gabe des Plasmamarkers FITC-Dextran stellt sich die Gefäßarchitektur im Intravitalmikroskop dar. Bild A) stammt von einem Kontrolltumor. Hier ist bereits ein ausgeprägtes Gefäßsystem zu sehen. Man erkennt die typische Heterogenität der Tumorgefäße. Zahlreiche Anastomosen und Gefäßschleifen sind zu erkennen. Die Durchmesser variieren und Gefäßabzweigungen gehen teilweise rechtwinklig voneinander ab. Bild B) zeigt die Situation am selben Tag in einem Tier, das mit dem RGD-Peptid behandelt wurde. Im gesamten Bildausschnitt ist nur ein Gefäß zu erkennen. Außerdem ist ein für die Angiogenese typischer Gefäßspross zu erkennen (Pfeil), der sich aus dem bereits gebildeten Gefäß entwickelt hat.

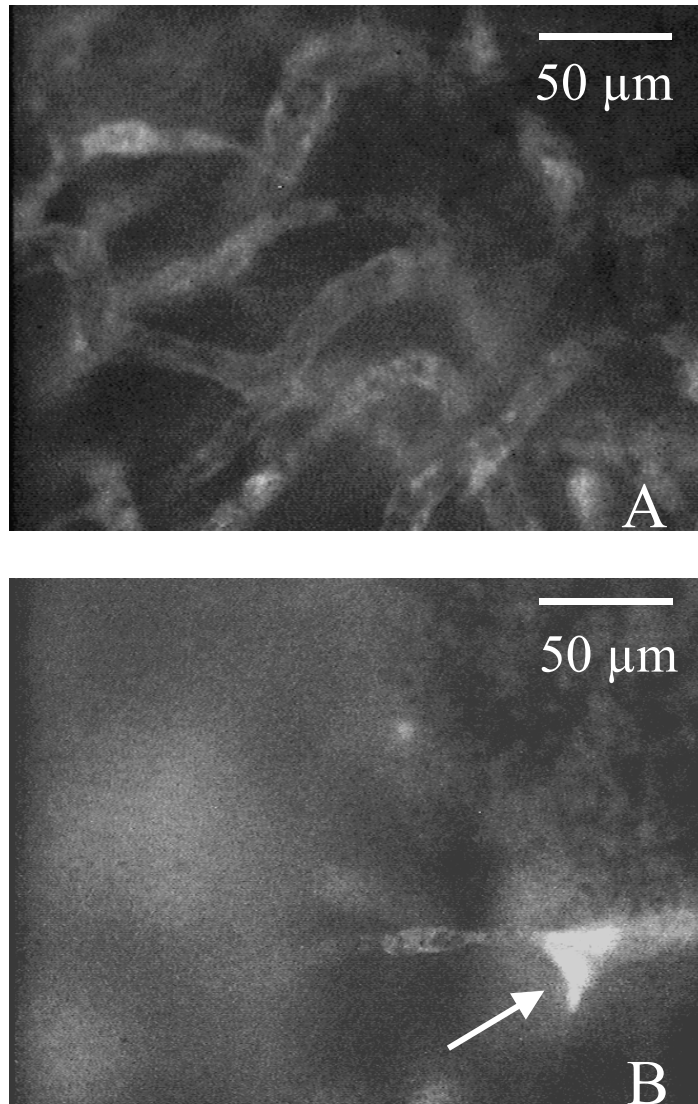


Abbildung 16: Tumormikrozirkulation am Tag 3 nach Tumorzellimplantation

Die beiden Bilder zeigen die Tumormikrozirkulation am Tag 3 nach Tumorzellimplantation, wie sie sich nach Injektion des Plasmamarkers FITC-Dextran im Intravitalmikroskop darstellt. Bild A: Im Kontrolltumor stellt sich bereits die typisch heterogene Gefäßarchitektur dar. In Bild B zeigt der mit RGD-Peptid behandelte Tumor nur ein Gefäß, aus dem sich ein Gefäßsproß (Pfeil) als Zeichen der frühen Angiogenese heraus entwickelt.

Die quantitative Analyse der funktionellen Gefäßdichte (Abb. 17 und Tab. 2) bestätigt am Tag drei nach Tumorzellimplantation die Beobachtungen aus Abbildung 16. Die funktionelle Gefäßdichte war bei den mit RGD-Peptid behandelten Tumoren signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Am Tag fünf nach Tumorzellimplantation erreicht die Gefäßdichte der Kontrollgruppe bereits ihr Maximum und nimmt von da an bis zum Tag 13 wieder ab. In der RGD-Gruppe ist die Gefäßdichte dagegen erst am Tag neun signifikant gegenüber dem Tag drei erhöht. Sie erreicht ihr Maximum also wesentlich später. Am Tag 13 ist dann die Gefäßdichte der Kontrollgruppe niedriger als in der RGD-Gruppe.

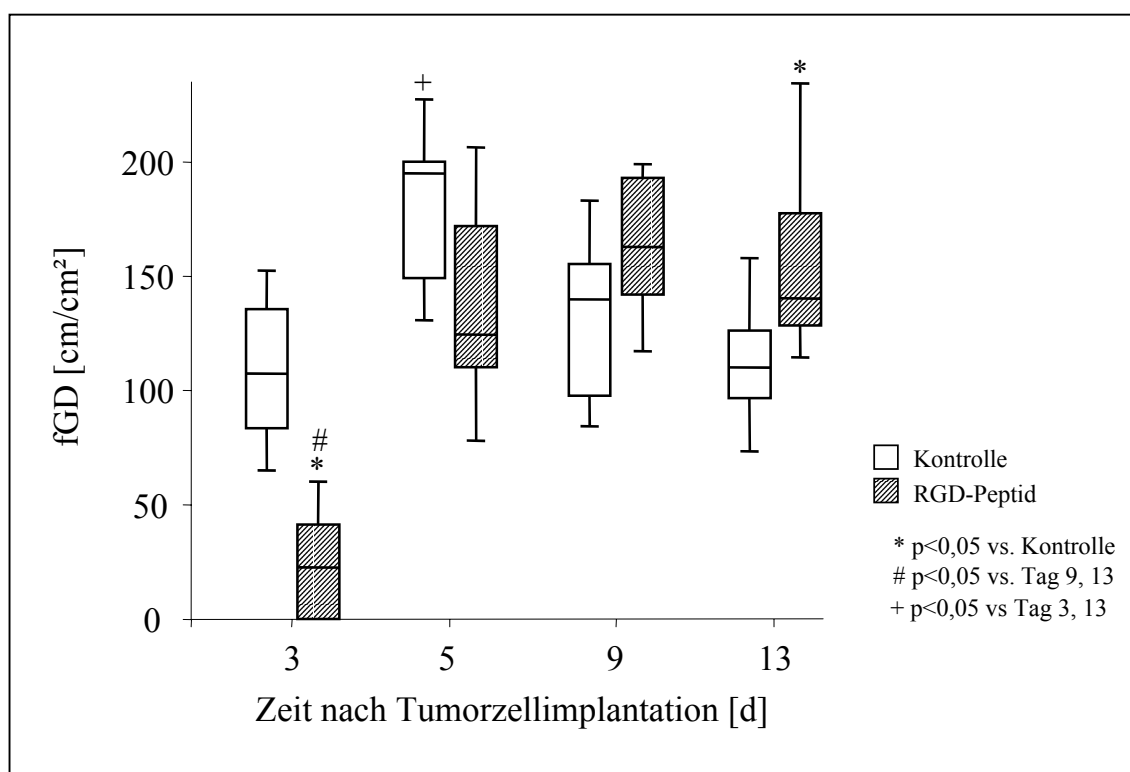


Abbildung 17: Funktionelle Gefäßdichte

Dargestellt ist die funktionelle Gefäßdichte (fGD) der Kontrollgruppe und der RGD-Gruppe an den Tagen 3, 5, 9 und 13 nach Tumorzellimplantation. Therapiebeginn war einen Tag nach Implantation der Tumorzellen. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. Tag 9, 13; + $p < 0,05$ vs. Tag 3, 13.

Tabelle 2: Funktionelle Gefäßdichte

Dargestellt ist die funktionelle Gefäßdichte der Kontrollgruppe und der RGD-Gruppe an den Tagen 3, 5, 9 und 13 nach Tumorzellimplantation. Es sind Mittelwert plus/minus dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Funktionelle Gefäßdichte [cm/cm ²]				
Tage nach Tumorzellimplantation	Tag 3	Tag 5	Tag 9	Tag 13
Kontrollgruppe	105,2 ± 11,26	179,1 ± 12,9	138,2 ± 13,8	108,3 ± 10,6
RGD-Peptid	37,2 ± 12,0	132,8 ± 20,0	163,0 ± 8,9	156,9 ± 15,6

2.2. Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit als Hinweis auf die Durchblutung der Gefäße ist in Abbildung 18 und Tabelle 3 dargestellt. Am Tag drei nach Tumorzellimplantation zeigt sich eine deutlich niedrigere Fließgeschwindigkeit in den Tumorgefäßen der RGD-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Am Tag fünf haben sich die Fließgeschwindigkeiten in den beiden Gruppen zunächst angeglichen, wobei sie in der RGD-Gruppe signifikant gegenüber Tag drei angestiegen ist. Im weiteren Verlauf ist zu sehen, daß die Erythrozytenfließgeschwindigkeit der Kontrollgruppe am Tag neun gegenüber dem Tag drei zugenommen hat, um dann tendentiell wieder abzunehmen. In der RGD-Gruppe bleibt die Fließgeschwindigkeit ab Tag fünf nahezu gleich.

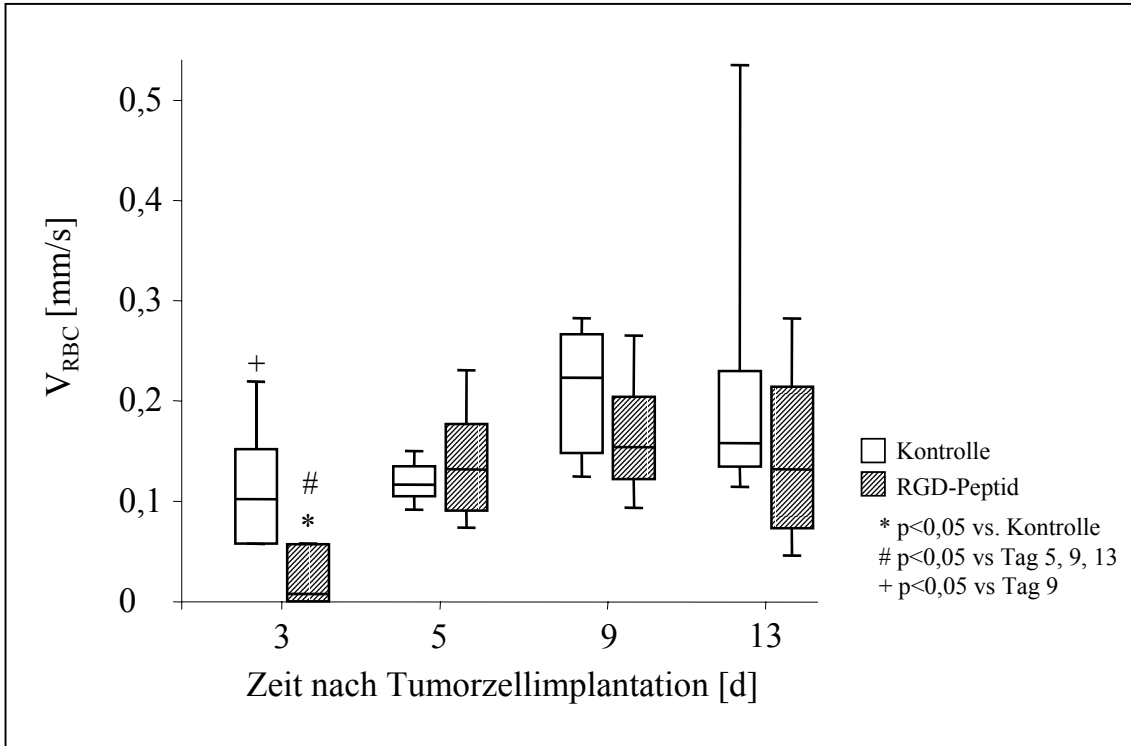


Abbildung 18: Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Dargestellt ist die Erythrozytenfließgeschwindigkeit (V_{RBC}) der Kontrollgruppe und der RGD-Gruppe an den Tagen 3, 5, 9 und 13 nach Tumorzellimplantation. Die Behandlung mit dem jeweiligen Peptid erfolgte ab dem ersten Tag nach Implantation der Tumorzellen im zwölfstündigen Abstand mit 30mg/kg KG i.p. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. Tag 5, 9, 13; + $p < 0,05$ vs. Tag 9.

Tabelle 3: Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Dargestellt ist die Erythrozytenfließgeschwindigkeit der Kontrollgruppe und der RGD-Gruppe an den Tagen 3, 5, 9 und 13 nach Tumorzellimplantation. Es sind Mittelwert plus/minus dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Erythrozytenfließgeschwindigkeit [mm/s]				
Tage nach Tumorzellimplantation	Tag 3	Tag 5	Tag 9	Tag 13
Kontrollgruppe	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,26 ± 0,06
RGD-Peptid	0,03 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,03

2.3. Gefäßdurchmesser

Die Behandlung mit dem RGD-Peptid hatte keinen Einfluß auf die Durchmesser der Gefäße der Tumoren. Abbildung 19 und Tabelle 4 zeigen, daß im gesamten Versuchszeitraum keine Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen waren. Die Durchmesser blieben weitgehend konstant. Allerdings fällt anhand der Boxplots auf, daß zu den späteren Meßzeitpunkten die einzelnen Durchmesser in der Kontrollgruppe eine höhere Streuung zeigen als in der Verum-Gruppe.

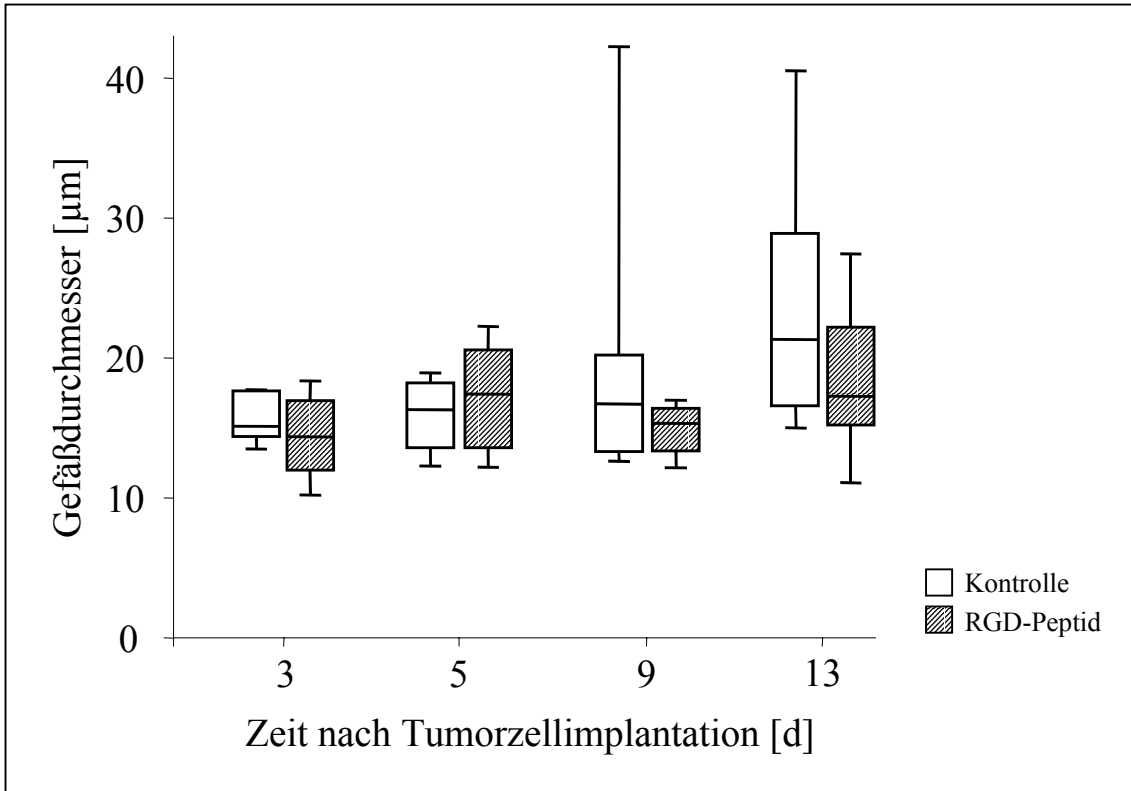


Abbildung 19: Gefäßdurchmesser

Dargestellt sind die Gefäßdurchmesser der Kontrollgruppe und der RGD-Gruppe an den Tagen 3, 5, 9 und 13 nach Tumorzellimplantation. Die Behandlung mit dem jeweiligen Peptid erfolgte ab dem ersten Tag nach Implantation der Tumorzellen im zwölfstündigen Abstand mit 30mg/kg KG i.p. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4: Gefäßdurchmesser

Dargestellt ist der Gefäßdurchmesser der Kontrollgruppe und der RGD-Gruppe an den Tagen 3, 5, 9 und 13 nach Tumorzellimplantation. Es sind Mittelwert plus/minus dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Gefäßdurchmesser [μm]				
Tage nach Tumorzellimplantation	Tag 3	Tag 5	Tag 9	Tag 13
Kontrollgruppe	15,4 \pm 0,9	16,3 \pm 1,2	21,8 \pm 3,9	24,0 \pm 3,4
RGD-Peptid	14,3 \pm 1,2	17,6 \pm 1,8	15,8 \pm 1,0	21,0 \pm 2,3

2.4. Erythrozytenfließgeschwindigkeit vs. Gefäßdurchmesser

Um die dynamischen Veränderungen im Rahmen der Tumorangio-genese und die Heterogenität der Meßwerte der Tumormikrozirkulation zu verdeutlichen, sind in Abbildung 20 die Durchmesser einzelner Blutgefäße gegen die Erythrozytenfließgeschwindigkeit aufgetragen. Jedes untersuchte Gefäß ist als Kreissymbol dargestellt. Am Tag drei zeigt sich in der Kontrollgruppe ein relativ konstanter Durchmesser bei geringer Fließgeschwindigkeit. Im weiteren Verlauf der Tumorangio-genese nehmen Fließgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser bei zunehmender Streuung der Meßwerte tendentiell zu. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war in der RGD-Gruppe am Tag drei die Anzahl der Gefäße deutlich geringer. Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit war bei einigen Gefäßen nahezu null. Im weiteren Verlauf verhält sich die Verumgruppe weitgehend ähnlich wie die Kontrollgruppe, allerdings ist die Streuung der Meßwerte weniger stark ausgeprägt.

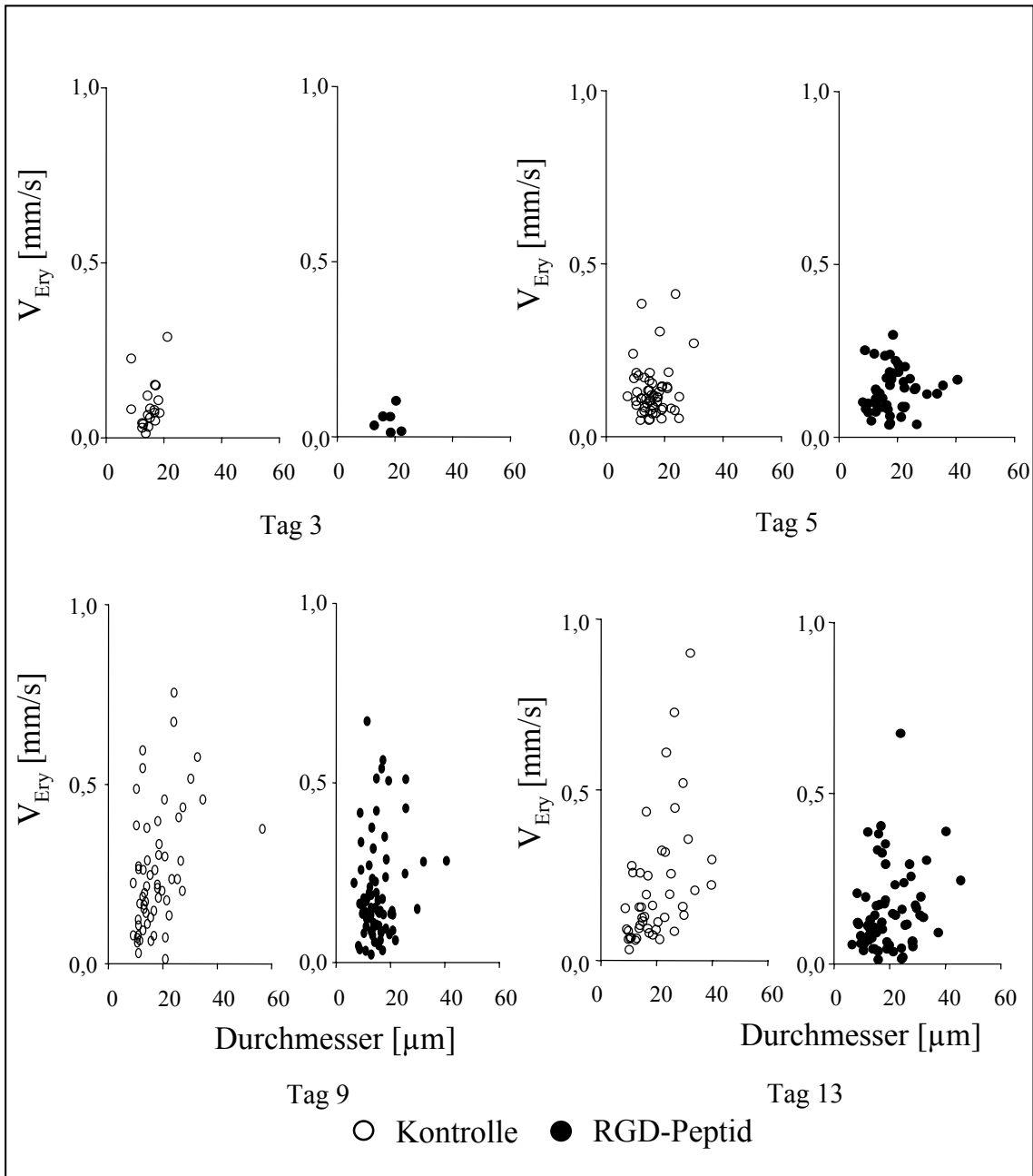


Abbildung 20: Erythrozytenfließgeschwindigkeit vs. Gefäßdurchmesser

Aufgetragen ist für jeden Beobachtungstag die Erythrozytenfließgeschwindigkeit (V_{RBC}) gegen den Gefäßdurchmesser. Dabei repräsentiert jedes Kreis-Symbol ein untersuchtes Gefäß.

2.5. Volumenfluß

Der Volumenfluß berechnet sich aus Gefäßdurchmesser und Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten. Die Werte der beiden Gruppen sind in Abbildung 21 und Tabelle 5 dargestellt. In der Kontrollgruppe bleibt der Volumenfluß über den gesamten Versuchszeitraum annähernd konstant. Auffallend ist aber auch hier die starke Streuung der Werte um den Median am Tag neun und 13 der Kontrollgruppe. In der RGD-Gruppe ist der Volumenfluß am Tag drei zunächst geringer als in der Kontrollgruppe. Am Tag fünf steigt er signifikant gegenüber dem Tag drei an und bleibt dann annähernd gleich. Die Streuung um den Median ist in dieser Gruppe weniger ausgeprägt.

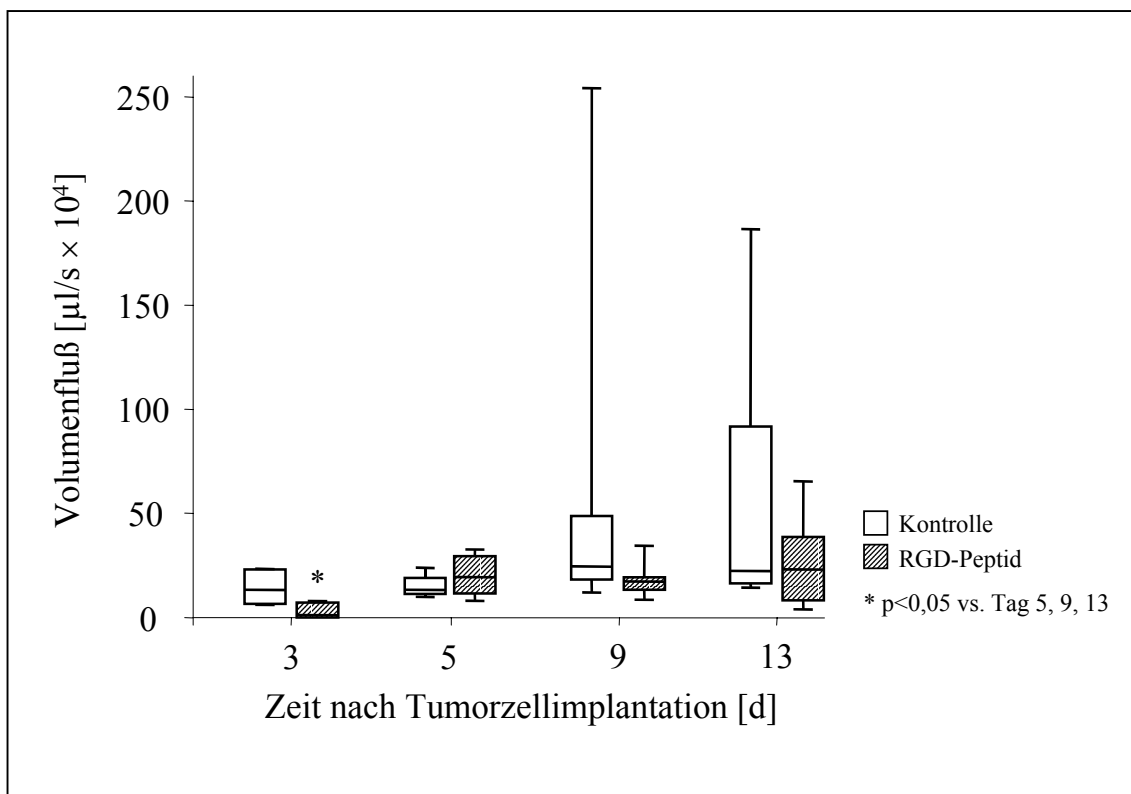


Abbildung 21: Volumenfluß

Dargestellt ist der Volumenfluß, berechnet nach der Formel $Q = (V_{\text{RBC}} / 1,6) \cdot (d/2)^2 \cdot 3,14$ der Kontrollgruppe und der RGD-Gruppe an den Tagen 3, 5, 9 und 13 nach Tumorzellimplantation. Die Meßwerte sind in Boxplots dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * p < 0,05 vs. Tag 5, 9, 13.

Tabelle 5: Volumenfluß

Dargestellt ist der Volumenfluß der Kontrollgruppe und der RGD-Gruppe an den Tagen 3, 5, 9 und 13 nach Tumorzellimplantation. Es sind Mittelwert plus/minus dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Volumenfluß [$\mu\text{l/s} \cdot 10^4$]				
Tage nach Tumorzellimplantation	Tag 3	Tag 5	Tag 9	Tag 13
Kontrollgruppe	14,5 \pm 4,0	16,8 \pm 2,4	74,0 \pm 31,1	66,4 \pm 22,6
RGD-Peptid	3,3 \pm 1,4	21,7 \pm 4,4	24,4 \pm 5,2	45,1 \pm 18,0

2.6. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

In Tabelle 6 ist das Verhalten der Leukozyten in den Tumorgefäßen gezeigt. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes waren im Rahmen der Tumorangiogenese äußerst selten rollende oder adhärente Leukozyten zu sehen. Dieser Sachverhalt veränderte sich auch nicht unter Behandlung mit dem RGD-Peptid.

Tabelle 6: Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Tabelle zeigt die Meßwerte rollender und adhärenter Leukozyten im Verlauf der Tumorangiogenese für beide Gruppen. Die Meßwerte sind angegeben als Mittelwert plus/minus dem Standardfehler des Mittelwertes. Rollende Leukozyten als Zellen/min. Adhärenente Leukozyten als Zellen/mm².

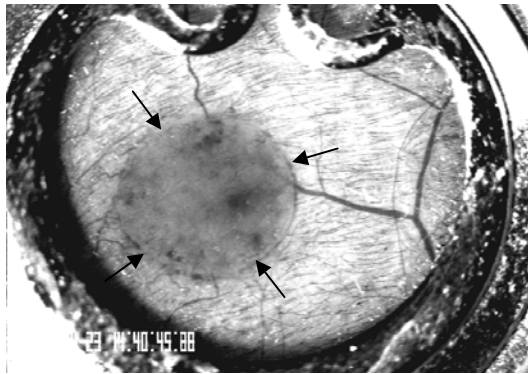
Leukozyten-Endothelzell-Interaktion				
Tage nach Tumorimplantation	Rollende Leukozyten (Zellen/min)		Adhärenente Leukozyten (Zellen/mm ²)	
	Kontrolle	RGD-Peptid	Kontrolle	RGD-Peptid
3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2
5	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1
9	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.5	0.1 ± 0.1
13	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0

2.7. Tumorwachstum in der transparenten Rückenhautkammer

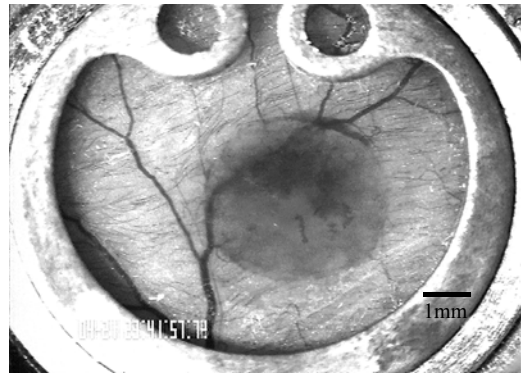
Parallel zu den intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde über den Versuchszeitraum videomakroskopisch die Fläche des Tumors in der Rückenhautkammer bestimmt. In Abbildung 22 sind beispielhaft die Tumoren von 4 Tieren dargestellt. Bild A zeigt einen Kontrolltumor am Tag 5 nach Tumorzellimplantation, Bild C denselben Tumor vier Tage später. Er hat deutlich an Größe zugenommen. Bild B demonstriert einen Tumor, der mit dem RGD-Peptid behandelt wurde. Am Tag fünf ist zwischen beiden Gruppen noch kaum ein Unterschied in der Größe festzustellen. In Bild D ist derselbe Tumor zu sehen wie in Bild B, aber vier Tage später. Dieser hat an Größe kaum zugenommen und ist deutlich kleiner als der Kontrolltumor in Bild C.

Videomakroskopisch läßt sich somit eine Verzögerung des Tumorwachstums unter RGD-Peptid Behandlung feststellen.

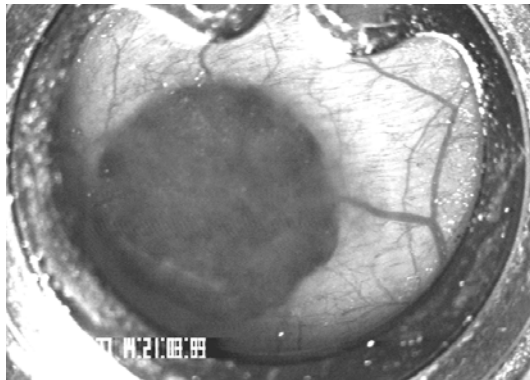
Die Quantifizierung des Tumorwachstums in der Rückenhautkammer zeigt die Abbildung 23. Wie schon bereits auf den Bildern in Abbildung 22 zu erkennen war, zeigen sich am Tag fünf nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Am Tag neun nach Tumorzellimplantation sind dagegen Größendifferenzen zu erkennen. Noch deutlicher wird der Unterschied am Tag 13. Die Kontrolltumoren haben bereits eine Fläche von fast 80 mm² erreicht. Die mit RGD-Peptid behandelten Tumoren liegen bei ca. 50 mm².



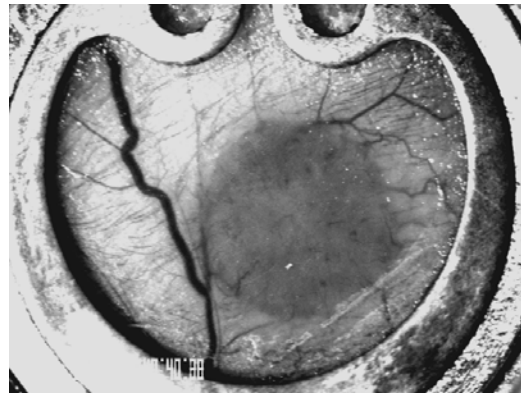
A)



B)



C)



D)

Abbildung 22: A-Mel-3 in der Rückenhautkammer

Die Bilder zeigen das A-Mel-3 in der transparenten Rückenhautkammer, wie sie durch Videomakroskopie dargestellt werden können. Die Pfeile markieren den Tumorrand. A) Tumor der Kontrollgruppe, 5 Tage nach Tumorzellimplantation. C) Der Tumor des selben Tieres 4 Tage später. B) Ein Tumor der RGD-Gruppe am Tag 5 und D) derselbe Tumor 4 Tage später und deutlich kleiner als der Tumor in C). Der Durchmesser des Beobachtungsfensters beträgt etwa 11mm.

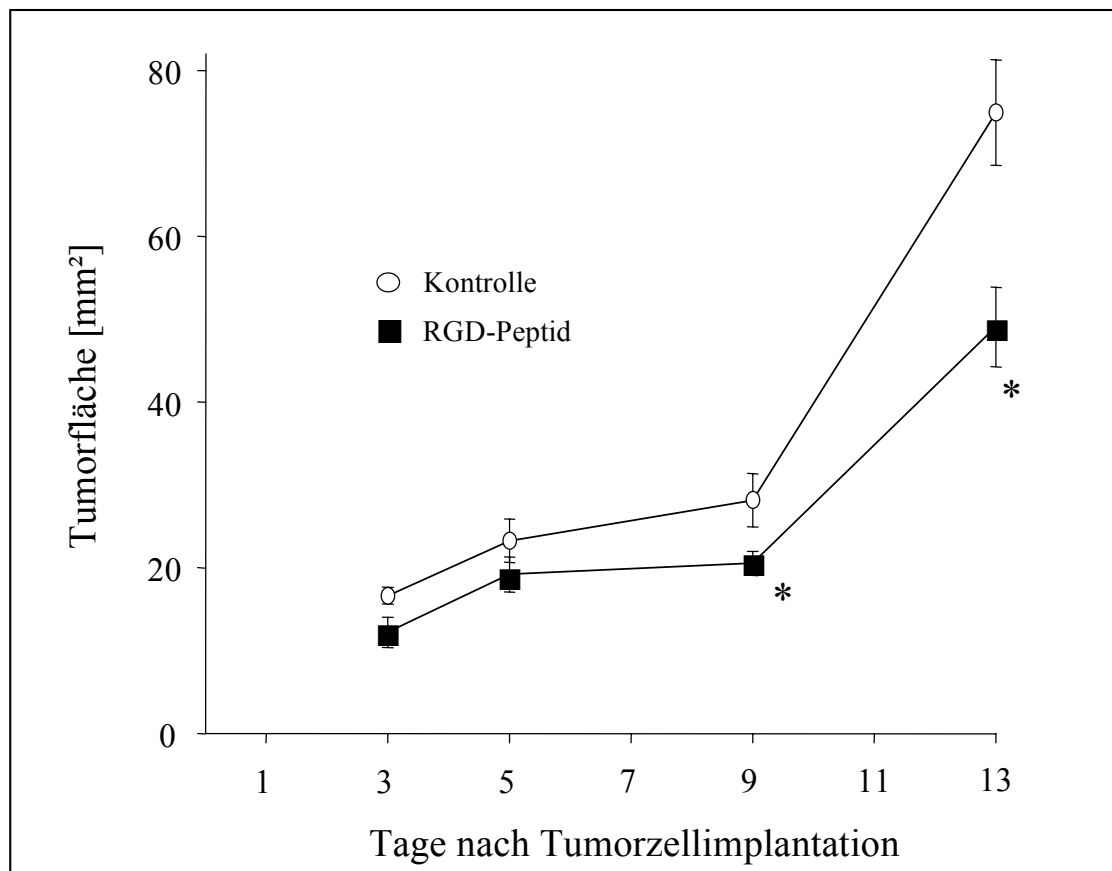


Abbildung 23: Tumorfläche in der Rückenhautkammer

Dargestellt ist die quantitative Analyse der Tumorfläche in der Rückenhautkammer mit Hilfe der videomakroskopischen Aufnahmen an den Tagen 3, 5, 9 und 13 nach Tumorzellimplantation. Eingetragen sind Mittelwert plus/minus dem Standardfehler des Mittelwertes für die scheinbehandelte Kontrollgruppe, und die mit dem Peptidantagonisten (30mg/kg) alle 12 Stunden ab Tag eins nach Tumorzellimplantation behandelten Tiere. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

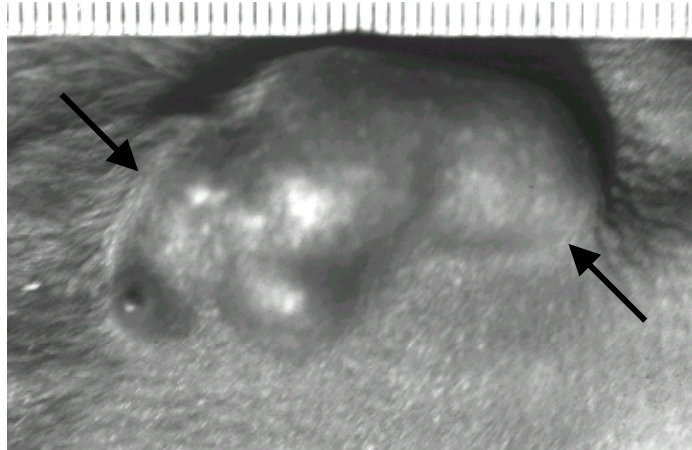
3. Ergebnisse der Untersuchungen zum subkutanen Tumorwachstum

Mit Hilfe des unter die Hamsterrückenhaut implantierten amelanotischen Melanoms A-Mel-3 wurde in einer eigenen Versuchsreihe untersucht, welchen Effekt das RGD-Peptid auf Wachstum und Metastasierung des Tumors hat.

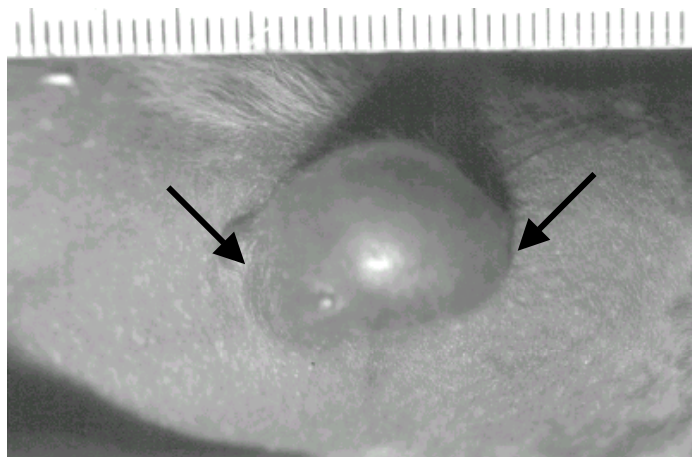
3.1. Messung des Tumorwachstums

Während des Versuchszeitraumes wurden die subkutanen Tumoren unter der Hamsterrückenhaut regelmäßig photographiert. Abbildung 24 zeigt exemplarisch die Aufsicht auf die Rückenhaut des Hamsters. Deutlich zu erkennen sind die subkutan wachsenden Tumoren. Bild A zeigt ein Kontrolltier mit einem neun Tage alten Tumor der Größe 29 * 15 * 5 mm. Bild B stellt einen Tumor da, wie er sich bei einem mit RGD-Peptid behandelten Tier ebenfalls neun Tage nach Tumorzellimplantation entwickelt hat. Er ist deutlich kleiner und mißt ca. 16 * 11 * 5 mm.

In Abbildung 25 sind Tumorwachstumskurven der beiden Gruppen wiedergegeben. Die Ausgangsvolumina der Gruppen unterschieden sich statistisch nicht signifikant. Die Kontrolltumoren zeigten ein exponentielles Wachstum, wie es für das A-Mel 3 typisch ist. Die Behandlung mit dem RGD-Peptid bewirkte eine deutliche Verzögerung des Wachstums ab Tag sieben nach Tumorzellimplantation. Spontanregressionen wurden nicht beobachtet.



A)



B)

Abbildung 24: Subkutanes Tumorwachstum

Photographie des A-Mel-3, 9 Tage nach subkutaner Implantation der Tumorzellen unter die Rückenhaut des Hamsters. Bild A zeigt den Tumor eines Kontrolltieres; das Tier in Bild B wurde mit dem RGD-Peptid behandelt. Die Pfeile markieren den Tumorrund. Ein Intervall auf der Skala entspricht 1 mm.

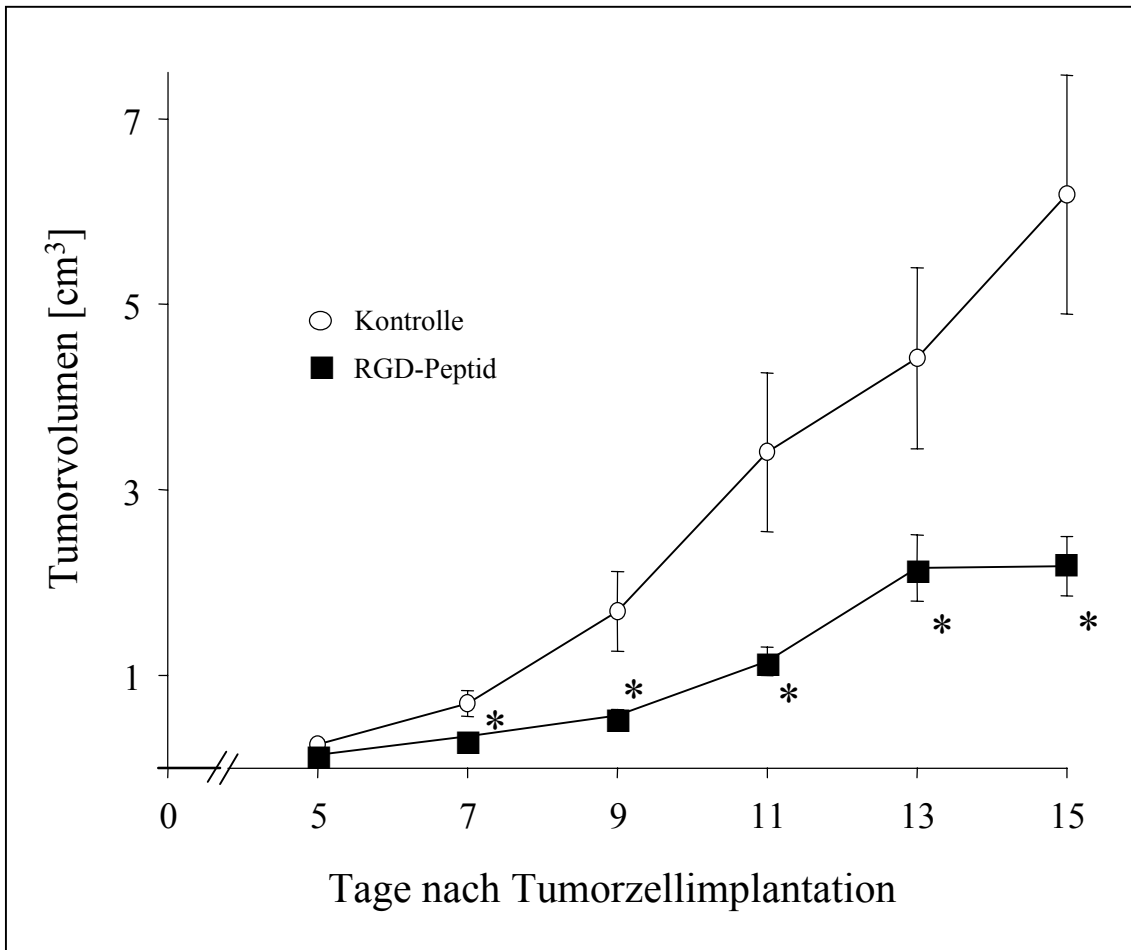


Abbildung 25: Tumorwachstumskurven

Die Kurven zeigen das Tumorwachstum der beiden Versuchsgruppen über den Zeitraum von 15 Tagen. Eingetragen sind Mittelwert plus/minus dem Standardfehler des Mittelwertes für die scheinbehandelte Kontrollgruppe, und die mit dem Peptidantagonisten (30mg/kg) alle 12 Stunden behandelten Tiere. Die Behandlung mit dem jeweiligen Peptid erfolgte ab dem ersten Tag nach Implantation der Tumorzellen. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.2. Wachstumsverzögerung

Tabelle 7 zeigt aus den Wachstumsdaten durch logarithmische Interpolation berechnete Wachstumszeiten, die die Tumoren nach Behandlung bis zum Erreichen der vorgegebenen Volumina von 0,50, 1,00, 2,00 und 3,00 cm³ benötigten. Die Ausgangsvolumina der Tumoren unterschieden sich statistisch nicht signifikant.

Tabelle 7: Tumorwachstumszeiten

Die Werte entsprechen den berechneten Wachstumszeiten in Tagen für die beiden Versuchsgruppen. Die Zahlen geben die berechnete Zeit in Tagen an, die die Tumoren der jeweiligen Gruppe benötigen, um die angegebenen Volumina zu erreichen. Die Werte sind als Mittelwert plus/minus dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: * p < 0,05 vs. Kontrolle.

Tumorvolumen [mm ³]				
Gruppe	500	1000	1500	2000
Kontrollgruppe	6,6 ± 0,4	8,0 ± 0,4	9,1 ± 0,9	9,8 ± 0,4
RGD-Peptid	8,8 ± 0,4*	11,1 ± 0,6*	12,5 ± 1,8*	13,4 ± 0,8*

3.3. Metastasierung

Durch Palpation der axillären und inguinalen Lymphknotenregionen wurden die beiden Gruppen auf das Vorkommen von Metastasen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 nach der Methode von Kaplan und Meier dargestellt. Bis zum Tag sieben nach Tumorzellimplantation waren bei keinem Tier Metastasen palpabel. Am Tag neun traten bei zwei Tieren der Kontrollgruppe die ersten Metastasen auf. Ab Tag 11 hatten

alle Tiere der Kontrollgruppe tastbar vergrößerte Lymphknoten. Tiere, die mit RGD-Peptid behandelt wurden, zeigten dagegen am Tag neun noch keine vergrößerten Lymphknoten und am Tag 11 waren immer noch 50% der Tiere ohne Metastasen. Es dauerte insgesamt 17 Tage, also sechs Tage länger als in der Kontrollgruppe, bis auch das letzte Tier aus der Verum-Gruppe Metastasen dieses hoch aggressiven, schnell wachsenden und invasiven Tumors aufwies.

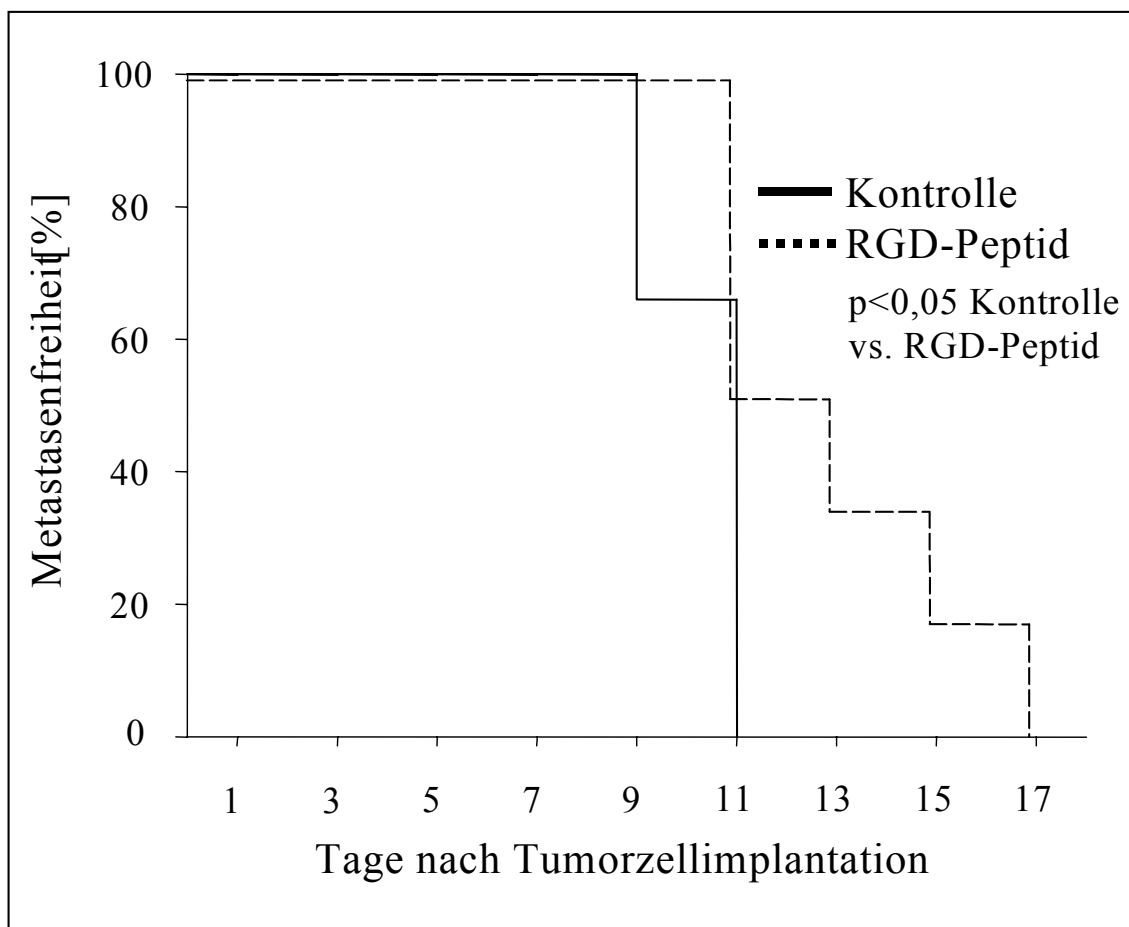


Abbildung 26: Metastasenfreiheit

Dargestellt ist das Auftreten von Metastasen in den axillären und inguinalen Lymphknoten nach der Methode von Kaplan und Meier. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Tiere ohne palpable Metastasen in Prozent des Ausgangswertes von n=6 pro Gruppe angegeben. Das Auftreten von Metastasen war in der RGD-Gruppe signifikant verzögert ($p < 0,05$).

D. DISKUSSION

1. Diskussion der Methodik

1.1. Versuchsmodelle

1.1.1. Quantifizierung der Tumorangiogenese

Folkman und Mitarbeiter konnten 1963 erstmals nachweisen, daß wachsende solide Tumoren ein Blutgefäßsystem zur Ernährung benötigen (Folkman *et al.* 1963). Weidner *et al.* erbrachten den Beweis, daß auch die Metastasierung von der Tumorangiogenese abhängt (Weidner *et al.* 1991). Seitdem wurden zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Modelle etabliert (Jain *et al.* 1997), um ein Verständnis für die Vorgänge bei der Bildung von neuen Blutgefäßen im Rahmen des Tumorwachstums und der Metastasierung zu gewinnen. Obgleich wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der molekularen und zellulären Biologie der Angiogenese aus *in vitro* Essays stammen (Montesano *et al.* 1986; Sankar *et al.* 1996) und diese den Vorteil bieten, bestimmte experimentelle Variablen genau zu definieren und beobachten zu können, hat sich doch gezeigt, daß der Vorgang der Tumorangiogenese ein äußerst komplexer Vorgang ist, der *in vitro* bisher nicht zufriedenstellend zu simulieren ist (Jain *et al.* 1997).

Seit Sandison 1924 erstmalig ein transparentes Kammermodell am Kaninchenohr zur Beobachtung der Neovaskularisierung während der Wundheilung einführte (Sandison, 1924), wurden derartige Modelle häufig für morphologische und beschreibende mikrozirkulatorische Untersuchungen verwendet. In der Folgezeit entstanden zahlreiche weitere Modelle, wobei Ide und Mitarbeiter als erste ein Kammermodell am Kaninchen benutzten, um die Angiogenese in einem implantierten Brown-Pearce Karzinom zu studieren (Ide *et al.* 1939). Großer Nachteil dieser und nachfolgender Kammermodelle war jedoch eine ausgeprägte Neovaskularisation im Sinne einer Granulations-

gewebsbildung, unabhängig von den implantierten Tumoren (Algire, 1943; Papenfuss *et al.* 1979).

Eine andere, weit verbreitete Methode zur Quantifizierung der Tumorangiogenese ist die histologische Auszählung der Tumorgefäße (Weidner *et al.* 1991). Bei diesem Verfahren werden Gewebeproben aus dem Tumor entnommen, deren Gefäße mit verschiedenen immunhistochemischen Färbetechniken (Anti-Faktor-VIII; Anti-CD31, Anti-CD34, etc.) dargestellt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Mit dieser Methodik konnten zahlreiche Erkenntnisse über die Rolle der Angiogenese beim Tumorwachstum und der Metastasierung gewonnen werden (Weidner *et al.* 1993; 1995). Jedoch wird das Verfahren gleichzeitig in der Literatur kontrovers diskutiert, da es einige Einschränkungen mit sich bringt (Vermeulen *et al.* 1996):

Die Gewinnung von Gewebeproben ist zunächst eine invasive Maßnahme, welche ein nicht unerhebliches Trauma im Gewebe hinterläßt oder sogar nur durch Tötung des Tieres möglich ist. Die erhaltene Gewebeprobe liefert nur einen „statischen“ Eindruck und wird somit kaum den funktionellen Status der Gefäße oder die dynamischen Veränderungen im zeitlichen Verlauf der Angiogenese adäquat wiedergeben (Eberhard *et al.* 2000). Die heterogenen Gewebe –und Gefäßstrukturen des Tumors selbst machen es zudem erforderlich, mehrfache Probeexcisionen zu entnehmen oder den gesamten Tumor zu untersuchen, um einen ausreichenden Eindruck über den Gefäßstatus zu bekommen. Die histologische Untersuchung des gesamten Tumors beinhaltet die Tötung des Tieres und macht eine kontinuierliche Beobachtung des selben Tumors im selben Tier über einen längeren Zeitraum unmöglich. Bleibt das Tier über den Versuchszeitraum am Leben, so sind nur wenige Biopsien möglich, und es ist nicht vorhersehbar, ob diese aus gut oder schlecht vaskularisierten Bereichen des Tumors stammen. In den erhaltenen Gewebeproben werden dann hauptsächlich sogenannte „Hot Spots“ untersucht; Regionen, die im Vergleich zum übrigen gewonnenen Gewebe eine vergleichsweise hohe Gefäßdichte aufweisen. Hier liegt gleichzeitig der Hauptkritikpunkt des Verfahrens. Die Selektion repräsentativer Tumorareale, die Auswahl der „Hot Spots“, das Auszählen der Gefäße pro Gesichtsfeld ist abhängig vom Untersucher und unterliegt somit einer erheblichen Subjektivität. Demzufolge ist die

Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens beeinträchtigt und schwankt je nach Beobachter (Vermeulen *et al.* 1996).

Unabhängig davon ist die Färbung des Tumorendothels mittels panendothelialer Marker im Rahmen der Tumorangiogenese mit Problemen behaftet. Studien haben gezeigt, daß obwohl das Faktor VIII Antigen hoch spezifisch für normale Gefäße ist, es auf dem Tumorendothel teilweise nicht exprimiert wird (Vermeulen *et al.* 1995). Für den Endothelzellmarker CD31 konnte gezeigt werden, daß er die Lymphgefäße des Wirtsgewebes mit anfärbt und es so zu falsch-positiven Zählungen der Gefäßdichte kommt (Vermeulen *et al.* 1996).

Es muß daher festgestellt werden, daß die Quantifizierung der Tumorangiogenese durch histologische Verfahren gegenwärtig keine eindeutigen Aussagen über die dynamischen Veränderungen im Verlauf der Tumorangiogenese zuläßt. Dies gilt insbesondere im Rahmen von Untersuchungen zur antiangiogenetischen Tumorthherapie, da hier auf die komplexen dynamischen Mechanismen während der Tumorangiogenese Einfluß genommen wird.

1.1.1.1. Das Modell der transparenten Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters

Das in dieser Arbeit verwendete Modell des A-Mel-3 in der transparenten Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters wurde am Institut für Chirurgische Forschung von Endrich und Mitarbeitern entwickelt (Endrich *et al.* 1980; Asaishi *et al.* 1981; Goetz, 1987). Dieses syngene Tumormodell ist in der Mikrozirkulationsforschung international etabliert und eingehend charakterisiert. Mit diesem Modell wurden vielfältige Untersuchungen betreffend Mikrozirkulation von normalem Gewebe und Tumorgewebe durchgeführt, wie z.B. Untersuchungen über vasoaktive Substanzen (Funk *et al.* 1983; Goetz *et al.* 1987), Anästhetika (Franke *et al.* 1982; Franke & Endrich, 1983), Hämodilution (Nolte *et al.* 2000; Oda *et al.* 1984), Hypo- und Hyperthermie (Reinhold & Endrich, 1986; Dellian *et al.* 1993a; 1994), Stoßwellen und photodynamische Therapie (Dellian, 1993a; 1993b; Gamarra *et al.* 1993; Dellian *et al.* 1994; Leunig *et al.* 1994a; Dellian *et al.* 1995; 1996a).

Die Mehrzahl der genannten Untersuchungen erfolgte durch Intravitalmikroskopie am wachen Tier und erlaubte so, über einen langen Zeitraum die Gefäßstrukturen des Tumors und des umliegenden Normalgewebes kontinuierlich zu beobachten, zu quantifizieren und photomakroskopisch zu dokumentieren. Hervorzuheben ist dabei die Tatsache, daß die Untersuchungen am wachen, also nicht-narkotisierten Tier vorgenommen werden können. Obwohl die Effekte der Inhalations –oder Injektionsnarkotika auf Durchblutung, Oxygenierung und Energiestoffwechsel der Tumoren kontrovers diskutiert werden (Zanelli *et al.* 1975; Franke *et al.* 1982; Okunieff *et al.* 1988; Menke & Vaupel, 1988), besteht doch Einigkeit darüber, daß diese schwer zu kontrollierende Variable wenn möglich auszuschließen ist.

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war u.a. die Frage, welchen Einfluß eine Inhibition der α_v -Integrine auf Tumormikrozirkulation und Tumorangiogenese *in vivo* hat. Bisherige *in vitro* Studien zeigten teilweise beeindruckende Effekte (Nicosia & Bonanno, 1991; Brooks *et al.* 1994a), doch fehlte bislang eine eindeutige Dokumentation über den Langzeiteffekt eines RGD-Peptids auf den wichtigsten Ort des Geschehens, die Tumormikrozirkulation *in vivo*. Unter diesem Aspekt wurde das Modell des A-Mel-3 in der transparenten Rückenhautkammer verwendet, da es ausgezeichnet dazu geeignet ist, nicht-invasiv, wiederholt über einen längeren Zeitraum am wachen Tier, *in vivo* die Tumorangiogenese zu untersuchen und zu quantifizieren. Die direkte Beobachtung der Tumorgefäße unter Behandlung mit dem RGD-Peptid dürfte außerdem neue Einblicke in die dynamischen Veränderungen und die Mechanismen der antiangiogenetischen Therapie bieten.

1.1.2. Das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3

In dieser Arbeit wurde das von Fortner *et al.* 1961 erstmals beschriebene, spontan entstandene amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3 verwendet. Der Tumor zeichnet sich durch eine Angehrate von 100% sowie durch rasches Wachstum und frühzeitige Metastasierung aus. Spontane Regressionen werden nicht beobachtet. Schon in frühen Stadien zeigt das A-Mel-3 eine ausgeprägte Tendenz zur bevorzugten Metastasierung in

die axillären und inguinalen Lymphknoten. Periaortale, pelvine und thorakale Lymphknotenmetastasen, sowie Organmetastasen in Lunge, Niere und Leber finden sich nach subkutaner Implantation erst im fortgeschrittenen Tumorstadium. (Fortner *et al.* 1961).

1.1.2.1. Dokumentation und Einschlußkriterien des A-Mel-3 in der Rückenhautkammer

Durch tägliche visuelle Kontrolle der Rückenhautkammer mit dem Photomakroskop, sowie durch die Dokumentation des Tumorwachstums in der Kammer konnte die Präparation der einzelnen Versuchstiere stetig überwacht und kontrolliert werden, um so die Einschlußkriterien einer intakten Mikrozirkulation zu erfüllen: Es wurde insbesondere darauf geachtet, daß sich kein Eiter, keine Blutungen, keine Anzeichen einer Entzündung, keine traumainduzierte Neovaskularisation, keine Ödembildung oder ausgeprägte Stase der Gefäße im Kammerareal befanden. Diese Kriterien sind Voraussetzung für eine repräsentative Tumorperfusion und umfassen damit Eigenschaften sowohl für den Tumor als auch für das umliegende Wirtsgewebe (Zweifach, 1973; Asaishi *et al.* 1981; Goetz, 1987).

1.1.2.2. Diskussion der Untersuchungstechniken im Rückenhautkammermodell

Zur quantitativen Analyse der Tumormikrozirkulation und Tumorangio-genese wurde die Technik der intravitalem Videofluoreszenzmikroskopie verwendet. Die wichtigsten Komponenten zur Visualisierung sind dabei eine Lichtquelle für Epi- und/oder Transillumination, ein Mikroskop, eine hochempfindliche Kamera und entsprechende Fluoreszenzfarbstoffe.

Die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie erlaubt die Quantifizierung der Tumormikrozirkulation im A-Mel-3, bestehend aus der Messung der funktionellen Gefäßdichte, Erythrozytenfließgeschwindigkeit, Gefäßdurchmesser und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Die Güte der Messungen mit Hilfe der hier verwendeten

Methoden ist am Institut für Chirurgische Forschung ausgiebig und detailliert untersucht und diskutiert worden. Für detaillierte Informationen sei auf die Veröffentlichungen aus den Arbeitsgruppen Endrich, Goetz, Nolte, Leunig (Asaishi *et al.* 1981; Endrich *et al.* 1982b; 1988b; Leunig *et al.* 1992b; 1994b; Nolte *et al.* 1997) und Dissertationsarbeiten von Goetz, Fritsch und Sinitsina hingewiesen (Goetz, 1987; Fritsch, 1996; Sinitsina, 2000).

Die Akkumulation von Fluoreszenzfarbstoffen in der Zelle kann unter bestimmten Umständen durch die anregende Lichtquelle zu phototoxischen Reaktionen im Normalgewebe führen (Miller *et al.* 1992; Saetzler *et al.* 1997; Steinbauer *et al.* 2000). Um in dieser Studie phototoxische Effekte ausschließen zu können, wurde entsprechend der Empfehlungen von Steinbauer *et al.* die Beleuchtungsintensität von $1\text{mW}/\text{cm}^2$ pro Bildaufnahme nicht überschritten. Untersuchungen zur photodynamischen Therapie in der transparenten Rückenhautkammer zeigten, daß bei dem hier verwendeten experimentellen Setup keine photodynamischen Effekte zu erwarten sind (Leunig *et al.* 1994a; Dellian *et al.* 1995).

1.1.3. Messung des subkutanen Tumorwachstums und der Metastasierung

Die Meßparameter der Tumormikrozirkulation erlauben eine quantitative Analyse der Angiogenese des Tumors unter Therapie. Entscheidend in der Krebstherapie ist jedoch insbesondere die Beeinflussung des Wachstums und der Metastasierung von Tumoren. Um die beobachteten Veränderungen der Tumormikrozirkulation nach Behandlung in diesen Zusammenhang einordnen zu können, wurden darüber hinaus Messungen des Tumorwachstums und der Metastasierung bei Anwendung der gleichen Therapiedosis durchgeführt.

Die Volumenberechnungen des halbellipsoidförmigen Tumors wurden durch Messungen von Weiss *et al.* (1990) für das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3 validiert. Bei der Vermessung der zu Behandlungsbeginn kleinen Tumoren spielt die Meßungenauigkeit von $\pm 0,5$ mm eine erhebliche Rolle, da sie dreifach in die Volumenberechnung eingeht. Spätestens ab Tag sieben nach Tumorzellimplantation,

wenn das durchschnittliche Tumolvolumen ca. 1cm^3 erreicht hat, hat die Meßungenauigkeit für die Berechnung des Tumolvolumens jedoch nur noch einen geringen Einfluß auf den berechneten Wert (Weiss *et al.* 1990). Eine Angabe der Tumorumfänge in Prozent der Ausgangswerte wurde daher nicht durchgeführt.

Aufgrund der ausgeprägten Tendenz zur Metastasierung in die axillären und inguinalen Lymphknoten schon in frühen Stadien (Fortner *et al.* 1961), wurde der Status während des Versuches durch Palpation ermittelt und so auf eine wiederholte Biopsie der Lymphknoten verzichtet. Nach Beendigung der Versuche wurden Proben zur histologischen Verifizierung des Status der Metastasierung entnommen.

1.2. Antagonisierung der α_v -Integrine durch das zyklische RGD-Peptid

Das in dieser Studie erstmalig *in vivo* verwendete zyklische RGD-Peptid wurde von der Firma Merck KGaA Darmstadt synthetisiert und charakterisiert. Bei EMD 121974 (Verum) handelt es sich dabei um ein Peptid, das von der Arbeitsgruppe um Horst Kessler entwickelt und beschrieben wurde (Dechantsreiter *et al.* 1999).

1.2.1 RGD-Peptide: Einsatz in Therapie und Diagnostik

Der therapeutische und diagnostische Einsatz zyklischer RGD-Peptide gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Verantwortlich dafür ist die Erkenntnis, daß die Sequenz aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat (RGD) als Erkennungssequenz für eine Vielzahl von Proteinen gilt (vgl. Einleitung Kapitel 3 und 5) (Ruoslahti & Pierschbacher, 1986; Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). Diese Proteine, zu denen man gegenwärtig Fibronectin, Vitronectin, Osteopontin, Kollagene, Thrombospondin, Fibrinogen und von Willebrandfaktor zählt, finden sich sowohl im Blut als auch in der extrazellulären Matrix (ECM). Die RGD-Sequenz von jedem dieser adhäsiven Proteine wird von einer bestimmten Familie von Adhäsionsrezeptoren, den Integrinen, erkannt. (Hynes, 1992; Ruoslahti & Reed, 1994). Einige dieser Rezeptoren

binden nur an die RGD-Sequenz eines Proteins, wogegen Andere mehrere Gruppen dieser Proteine erkennen können (Ruoslahti & Engvall, 1997). Dabei spielt die Konformation der RGD-Sequenz in dem individuellen Protein wohl eine entscheidende Rolle (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987; Dechantsreiter *et al.* 1999).

In der Pathophysiologie des Leber –und Nierenversagens ist die abnorme Funktion der Integrine, welche die RGD-Sequenz erkennen, von Bedeutung. Daher wird derzeit experimentell versucht, therapeutisch mittels modifizierten synthetischen RGD-Peptiden, Fortschritte in der Behandlung von chronischem Nierenversagen und Leberzirrhose zu erzielen (Bruck *et al.* 1997; Horton, 1999).

Im Rahmen der Blutgerinnung spielt das Membran-Glykoprotein $\alpha_{IIb}\beta_3$ (=Glykoprotein IIb/IIIa) auf Thrombozyten eine wichtige Rolle, da es eine RGD-abhängige Plättchenadhäsion und Aggregation vermittelt. Untersuchungen an Hunden zeigten, daß die Verabreichung eines synthetischen RGD-Peptids eine Hemmung der Thrombozytenaggregation (Tschopp *et al.* 1994) bewirkte und führten letztlich zur Entwicklung neuer Thrombozytenaggregationshemmer, die heute u.a. im Rahmen des akuten koronaren Syndroms eingesetzt werden (Bhatt & Topol, 2000; Sabatine & Jang, 2000).

Ein weiteres Einsatzgebiet von RGD-Peptiden stellen pathologische Situationen dar, bei denen es zu einer übermäßigen Blutgefäßneubildung kommt. Nicosia *et al.* haben nachgewiesen, daß sich mit RGD-Peptiden die nicht-tumorabhängige Angiogenese *in vitro* hemmen läßt (Nicosia & Bonanno, 1991). So konnten mit Hilfe von RGD-Peptiden experimentelle Erfolge bei der Behandlung der retinalen Neovaskularisation und der rheumatoiden Arthritis erzielt werden (Hammes *et al.* 1996; Storgard *et al.* 1999).

Versuche aus der Arbeitsgruppe von Brooks und Cheresh zeigten, wie schon in der Einleitung erwähnt, welche Bedeutung den RGD-Peptiden in der Tumorangiogenese zukommt. Hier wurde an der Chorioallantoismembran erstmals gezeigt, daß sich die tumorinduzierte Angiogenese durch zyklische RGD-Peptide hemmen läßt (Brooks *et al.* 1994a; Brooks *et al.* 1994b).

Die Tatsache, daß RGD-Peptide spezifisch Integrinrezeptoren besetzen können, läßt sich auch für diagnostische Verfahren nutzbar machen. Selektive, radioaktiv markierte

RGD-Peptide gegen das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurden von Haubner und Mitarbeitern eingesetzt (Haubner *et al.* 1999). Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wird verstärkt auf proliferierenden Endothelzellen im Rahmen der Tumorangiogenese exprimiert (Brooks *et al.* 1994b). Haubner *et al.* konnten zeigen, daß sich mit den markierten RGD-Peptiden die Tumorgefäße spezifisch visualisieren ließen. Dies könnte in Zukunft eine geeignete Möglichkeit darstellen, Tumoren nicht-invasiv zu diagnostizieren (Haubner *et al.* 1999; Haubner *et al.* 2001).

1.2.2. Optimierung eines RGD-Peptids zur Antagonisierung der α_v -Integrine

Wie bereits oben in Abschnitt 1.2.1. erwähnt findet sich die RGD-Sequenz auf zahlreichen Proteinen der extrazellulären Matrix als ein Erkennungssystem für eine Vielzahl von Liganden. Obwohl diese Sequenz so häufig existiert, erkennen jedoch die entsprechenden Liganden ihre individuelle Sequenz (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). Verantwortlich dafür scheint v.a. der Ligand bzw. die spezielle, dazu passende räumliche Konformation der RGD-Sequenz zu sein (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987; Gurrath *et al.* 1992). Ziel mußte also sein, die Konformation der RGD-Peptide so zu verändern, daß eine immer bessere Selektivität für einen speziellen Liganden erreicht werden konnte. Zudem waren die ursprünglichen linearen Tripeptide sehr anfällig für eine rasche Inaktivierung z.B. durch Peptidasen (Wormser *et al.* 1986; Haviv *et al.* 1993). Die Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften wie Selektivität, Stabilität, Wirkungsdauer und antagonistische Aktivität am Rezeptor konnte durch eine Reihe von Veränderungen erreicht werden. Die Einführung zweier weiterer Aminosäuren zu einem Pentapeptid ermöglichte den Ringschluß und somit eine erhöhte Stabilität gegenüber abbauenden Enzymen (Aumailley *et al.* 1991). Damit war es auch möglich, das zyklische Peptid räumlich zu verändern und so den ersten aktiven und selektiven Antagonisten gegen das $\alpha_v\beta_3$ Integrin zu synthetisieren (Kessler *et al.* 1995), der nun als Leitstruktur für die Entwicklung noch potenterer und selektiverer Peptide dienen konnte.

Von anderen synthetisch hergestellten Peptiden war bekannt, daß man durch die N-Methylierung bestimmter Aminosäurenreste die Konformation und die Affinität des

Peptids weiter verändern kann (Manavalan & Momany, 1980; Ron *et al.* 1992; Kessler *et al.* 1995). So konnte z.B. durch N^α-Methylierung der zyklische RGD-Antagonist des Membranglykoproteins $\alpha_{IIb}\beta_3$ so verändert werden, daß sich seine pharmakologischen Eigenschaften betreffend Bindungsaffinität und Selektivität bedeutend steigern ließen (Mazur *et al.* 1980; Bach *et al.* 1994). Die N-Methylierung des „RGD-Peptid-Rückgrats“, also die Einführung einer Methylgruppe zwischen der Amidbindung von Phenylalanin und Valin, führte zu dem *in vitro* hochaktiven und selektiven Peptid zyκλο(Arg-Gly-Asp-D-Phe(N-methyl)Val; (EMD121974; Merck KGaA, Darmstadt), welches in dieser Studie eingesetzt wurde (Dechantsreiter *et al.* 1999).

1.2.3. Selektivität des RGD-Peptids EMD121974

Die Fähigkeit des RGD-Peptids, die Bindung von Vitronectin oder Fibrinogen an ihre Rezeptoren zu verhindern, läßt sich mit einem linearen Standard-Peptid (G-RGD-SPK; Merck KGaA, Darmstadt) vergleichen. Als Rezeptoren dienen die isolierten und immobilisierten Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ (=Glykoprotein IIbIIIa). Die IC₅₀ gibt hier an, welche Konzentration nötig ist, um 50% der Integrin-Rezeptoren so zu blockieren, daß eine Bindung an die natürlichen Liganden (Vitronectin oder Fibrinogen) nicht mehr möglich ist. Für das lineare Standard-Peptid ergibt sich eine IC₅₀ von 0,21µM und für EMD121974 eine IC₅₀ von 0,58nM gegenüber dem in der Tumorigenese relevanten $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Gegenüber dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin, welches bei der Thrombozytenaggregation eine wichtige Rolle spielt, benötigt EMD121974 dagegen eine IC₅₀ von 0,86µM, also eine um den Faktor 1000 höhere Konzentration (Dechantsreiter *et al.* 1999). Damit wird verdeutlicht, daß eine hohe Selektivität von EMD121974 gegenüber dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ besteht. In Konzentrationen, bei denen es am $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor bereits einen antagonistischen Effekt aufweist, werden dagegen andere Integrine, wie z.B. $\alpha_{IIb}\beta_3$ in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt.

1.3. Antiangiogenetische Tumorthherapie durch Inhibition der α_v -Integrine

In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt eines zyklischen RGD-Peptids als Antagonist gegen α_v -Integrine hinsichtlich Angiogenese, Wachstum und Metastasierung von soliden Tumoren *in vivo* untersucht werden. Grundlage dafür waren insbesondere Untersuchungen von Brooks und Cheresch, die spezifische, gegen die α_v -Integrine gerichtete Antikörper verwendeten, um die Funktion der Integrine in der Angiogenese *in vitro* und am Modell der Chorioallantoismembran zu untersuchen (Brooks *et al.* 1994a; Brooks *et al.* 1994b).

1.3.1. Behandlung durch spezifische Antikörper

Aus *in vitro* Versuchen mit Antikörpern war bekannt, daß das Integrin $\alpha_v\beta_3$ einen Endothelzellrezeptor für eine Reihe von Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Vitronectin und von Willebrand Faktor darstellt (Cheresch, 1987). Einmal durch seinen Liganden aktiviert, initiiert das Integrin eine Reihe von kalzium-abhängigen intrazellulären Signalwegen, die u.a. zu Endothelzellmigration in der extrazellulären Matrix führen (Leavesley *et al.* 1993). Welche wichtige Rolle das Integrin $\alpha_v\beta_3$ in der Angiogenese spielt, zeigten ebenfalls Untersuchungen mit Antikörpern gegen $\alpha_v\beta_3$. Nach Blockade ließ sich durch verschiedene angiogenetische Stimuli keine Neubildung von Gefäßen in der Chorioallantoismembran mehr induzieren (Brooks *et al.* 1994b). Weitere Studien ergaben, daß sich auch die Tumorangio-genese in der Chorioallantoismembran mittels des spezifischen Antikörpers LM609 (Vitaxin) oder zyklischen RGD-Peptiden hemmen ließ. Daraus konnte die Erkenntnis gewonnen werden, daß das Integrin überwiegend auf proliferierenden Endothelzellen exprimiert wird und daher bereits existierende Blutgefäße durch eine Integrinblockade nicht beeinträchtigt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Blockade von $\alpha_v\beta_3$ mit LM609 zur Apoptose der angiogenetischen Endothelzellen führt (Brooks *et al.* 1994a).

Die Untersuchungen an der Chorioallantoismembran waren jedoch zeitlich auf maximal 48 Stunden begrenzt. Das bedeutet, daß sich der Einfluß der Integrinantagonisierung auf

die Angiogenese nur über einen kurzen Zeitraum beobachten läßt. Außerdem erlaubten die gewonnenen Ergebnisse keine Rückschlüsse auf einen Langzeiteffekt oder auf eine Wirkung im Säugetier. Ebenso wie bei Tumoren ist das Wachstum von metastasierten Tumorzellen von der Angiogenese am Ort der Absiedlung abhängig (Fidler & Ellis, 1994). Ob die Anwendung eines Integrin-Antagonisten also auch eine Wirkung auf die Metastasierung hat, konnte mit den Untersuchungen in der Chorioallantoismembran ebenfalls nicht geklärt werden.

1.3.2. Behandlung mit dem zyklischen RGD-Peptid

In der vorliegenden Studie kam der Integrin-Antagonist, das zyklische RGD-Peptid EMD121974, erstmalig über einen längeren Zeitraum in einem komplexen Organismus mit einem syngenem Tumormodell zum Einsatz. Im Gegensatz zu Antikörpern bietet das kleinmolekulare RGD-Peptid den Vorteil, daß es vergleichsweise einfach und kostengünstig zu synthetisieren, aufzubewahren und zu verabreichen ist. Eine potentielle Immunogenität, wie sie von Antikörpern bekannt ist, kann, bedingt durch das niedrige Molekulargewicht, ebenfalls als gering eingeschätzt werden. Die bisher im Rahmen der antiangiogenetischen Tumortherapie eingesetzten Antikörper sind hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften hinreichend charakterisiert. Bislang existierten jedoch keine Untersuchungen, in denen ein RGD-Peptid im Rahmen der Tumorangiogenese *in vivo* über einen längeren Zeitraum eingesetzt wurde.

2. Diskussion der Vorversuche zur Dosisfindung

2.1. Dosierung und Anwendung von RGD-Peptiden in der Literatur

Es war erforderlich, zunächst eine adäquate Dosierung zu finden, bei der eine Wirkung zu erwarten ist. RGD-Peptide waren wie in 1.2.1. erwähnt in anderen Bereichen Gegenstand intensiver Forschung. Tschopp und Mitarbeiter verwendeten RGD-Peptide,

um beim Hund und an humanen Saphena-Venen (HSVEC) die Thrombosebildung zu hemmen. Sie beobachteten dabei eine dosisabhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation im Dosisbereich zwischen 10 und 15 mg/kg KG (Tschopp *et al.* 1994). Die diabetische Retinopathie ist eine der Hauptursachen für Blindheit (Folkman, 1995a). Hammes und Kollegen untersuchten an einem Neovaskularisationsmodell der Mausretina den Effekt eines subkutan verabreichten zyklischen RGD-Peptids. Dabei verwendeten sie Dosen im Bereich von 1 bis 20 mg/kg KG im Abstand von 12 Stunden. Sie fanden ebenfalls eine dosisabhängige Inhibierung der retinalen Angiogenese ohne erkennbare Nebenwirkungen (Hammes *et al.* 1996). An einem ähnlichen Modell testeten Luna *et al.* zyklische RGD-Peptide (Luna *et al.* 1996). Bei Dosen von 1 bis 5 mg/kg KG zeigten sie, daß sich die Neovaskularisation ebenfalls dosisabhängig blockieren ließ. Dabei konnten sie außerdem nachweisen, daß es möglich war, auch das Integrin $\alpha_v\beta_5$ mit einem spezifischen Peptid zu hemmen. Dieses Integrin wurde kurz zuvor als ein weiterer Endothelzellrezeptor im Verlauf der Angiogenese identifiziert (Friedlander *et al.* 1995).

Auffällig war in allen hier zitierten Studien, daß keine erkennbaren Nebenwirkungen bei der Anwendung der Peptide beobachtet wurden. Dies ist im Einklang mit einem Hauptprinzip der antiangiogenetischen Tumorthherapie. Bisheriges Ziel der Krebstherapie ist die Krebszelle selbst. Der Einsatz von Chemo –oder Strahlentherapie führt bei den Patienten oft zu schweren Nebenwirkungen, da auch normale, gesunde Zellen in Mitleidenschaft gezogen wurden. Zielzelle der antiangiogenetischen Therapie ist ausschließlich die proliferierende Endothelzelle im wachsenden Blutgefäß. Da man davon ausgeht, daß sich Angiogenese physiologisch nur während der Embryonalentwicklung und im weiblichen Menstruationszyklus abspielt (D'Amore & Thompson, 1987; Folkman & Shing, 1992), wäre theoretisch kaum mit Nebenwirkungen zu rechnen (Folkman, 1996).

2.2. Diskussion der Ergebnisse zur Dosisfindung

Basierend auf den oben erwähnten Erkenntnissen und Überlegungen wurden in der vorliegenden Studie zunächst Vorversuche durchgeführt, um das pharmakologische Verhalten des Peptids im Syrischen Goldhamster charakterisieren zu können. Richtungsweisend für die Dosierung bei den Untersuchungen zur Pharmakokinetik waren dabei die unter 2.1. beschriebenen Studien. Unsere Studien zeigen, daß bei einer Dosierung von 15 mg/kg KG intraperitoneal die Halbwertszeit länger und die AUC größer ist als nach intravenöser Gabe, jedoch gleichzeitig die Plasmakonzentration des Peptids nach mehr als sechs Stunden auf nicht mehr nachweisbare Mengen abgefallen war. Hammes und Mitarbeiter verwendeten eine Peptid-Dosierung, wie oben beschrieben, von bis zu 20 mg/kg KG im Abstand von 12 Stunden (Hammes *et al.* 1996), ohne daß dabei erkennbare Nebenwirkungen festzustellen waren.

In den nächsten Vorversuchen ging es darum, ein geeignetes Zeitintervall für die Anwendung des Peptids zu finden. Es wurden daher 30 mg/kg KG in verschiedenen Zeitintervallen appliziert. Dies sollte zum Einen gewährleisten, daß möglicherweise für eine längere Zeit ein ausreichender Plasmaspiegel von Peptid aufrecht erhalten wird, und zum Anderen sollte beobachtet werden, ob bei dieser, im Vergleich zur Literatur relativ hohen Konzentration, erkennbare Nebenwirkungen auftreten. Freilich kann nicht einfach davon ausgegangen werden, daß sich durch Verdoppelung der Dosierung auch der Plasmaspiegel länger aufrecht erhalten läßt. Auch läßt die Halbwertszeit und AUC nur Rückschlüsse über die Bioverfügbarkeit des Peptids im Organismus zu, nicht aber über seine Wirksamkeit am Integrin-Rezeptor im Tumor (Fichtel *et al.* 1996). Charakteristika der Tumorangiogenese und des Tumorgefäßsystems sprechen jedoch dafür, daß das RGD-Peptid den Integrin-Rezeptor auf der Tumorendothelzelle erreicht: Die gute Vaskularisierung des Tumors gewährleistet ein rasches Anfluten der Substanz. Es ist bekannt, daß das Gefäßendothel im Tumor eine erhöhte Durchlässigkeit im Vergleich zum normalen Gefäßendothel besitzt (Gerlowski & Jain, 1986). Die α_v -Integrine werden im Rahmen der Angiogenese abluminal auf der Endothelzelle exprimiert, um dort die Kontakte zur extrazellulären Matrix herzustellen (Brooks, 1996). Es ist daher anzunehmen, daß der kleinmolekulare Peptidantagonist die Endothelzellbarriere durch die Lücken passiert, und abluminal den Integrin-Rezeptor

besetzt. Wie lange das Peptid den Rezeptor jedoch blockiert, darüber läßt sich keine Aussage machen. Dies kann u.a. von der Konzentration und den pharmakologischen Eigenschaften des Peptids abhängen, möglicherweise reicht aber auch die einmalige Absättigung der Rezeptoren aus, um einen inhibitorischen Effekt beobachten zu können.

Aufschlüsse über die Wirkung der Peptidapplikation konnten nur die Ergebnisse aus den Untersuchungen des Tumorwachstums und der Intravitalmikroskopie geben. Offensichtlich wurde jedoch, daß die Dosierung von 30 mg/kg KG, verabreicht im Abstand von 12h, den stärksten Effekt und bei den behandelten Tieren keine erkennbaren Nebenwirkungen zeigte: Sie nahmen gleichermaßen an Gewicht zu und legten ein normales Verhalten ohne Zeichen von krankhaften Veränderungen an den Tag, was die niedrige Toxizität des therapeutischen Prinzips der antiangiogenetischen Therapie mit RGD-Peptiden bestätigt. Aufgrund der kurzen HWZ des Peptids könnten weitere Untersuchungen Aufschluß darüber geben, ob mittels kontinuierlicher Gabe der antiangiogenetische Effekt optimieren werden kann.

3. Diskussion der Ergebnisse

3.1. Rolle der Angiogenese beim Tumorwachstum

In den frühen 1960er Jahren entstand eine neue Theorie über die Rolle von Blutgefäßen im Rahmen des Tumorwachstums. Tumorzellen, die in isoliert perfundierte Organe implantiert wurden, blieben kleine Spheroide, die nicht größer als 1mm³ wurden und keinerlei Blutgefäßwachstum zeigten (Folkman *et al.* 1963). Nach Reimplantation in ihren ursprünglichen Wirt kam es zur Neovaskularisierung und zum Wachstum. Weitere Experimente zeigten, daß Tumoren ohne das Einsprossen von Blutgefäßen kein größeres Volumen als 2-3mm³ erreichen können, und daß sich daraus eine neue therapeutische Möglichkeit ergeben könnte, das Tumorleiden zu behandeln (Folkman, 1971). Diese von Folkman aufgestellte Hypothese war in den folgenden Jahren

Gegenstand intensiver Forschung, die viele neue Erkenntnisse über die Rolle der Angiogenese im Tumorwachstum brachte. Heute stößt die Tatsache, daß das Tumorwachstum von der Angiogenese abhängig ist, auf eine breite Akzeptanz (Folkman, 1990).

Nach gegenwärtiger Meinung können maligne entartete Zellen oft jahrelang scheinbar „schlafend“ und sich nur durch Diffusion ernährend, in der Nähe von Blutgefäßen verbleiben (Folkman *et al.* 1989) (Abb. 1; Seite 4). In dieser prävasculären Phase sind die Tumorzellen jedoch keineswegs inaktiv. Sie vermehren sich ähnlich schnell wie in wachsenden, vaskularisierten Tumoren, aber ihre Vermehrungsrate steht im Gleichgewicht mit ihrem Zelluntergang (Holmgren *et al.* 1995; Folkman, 1995b). Die Ursache dafür, daß die Tumorzellen plötzlich eine angiogenetische Aktivität entwickeln, ist noch weitgehend unklar. Eine Hypothese besagt, daß es bedingt durch den hohen Zellumsatz, zu Mutationen in der Zelle kommt und sie so die Fähigkeit erlangen, angiogenetische Faktoren zu produzieren (Folkman, 1995b). Andere Untersuchungen konnten zeigen, daß zunehmende Hypoxie im Tumorzellverband die genetisch instabile Tumorzelle zur Sekretion von VEGF befähigt, der stark proliferierend auf Endothelzellen wirkt (Mukhopadhyay *et al.* 1995; Graeber *et al.* 1996). Basierend auf zahlreichen Untersuchungen findet jedoch der von Folkman und Hanahan geprägte Begriff des „Angiogenen Switch“ zunehmend Akzeptanz (Hanahan & Folkman, 1996). Darunter wird eine Art Schaltermechanismus verstanden, der durch Aktivatoren (z.B. VEGF, bFGF) und Inhibitoren (z.B. Angiostatin, Endostatin) der Angiogenese getriggert wird (Abb. 2; Seite 5). Solange der Tumorzellverband „schlafend“ im Gewebe vorliegt besteht ein Gleichgewicht. Der Wechsel der Tumorzellen zum angiogenen Phänotyp beinhaltet dann eine Veränderung des lokalen Gleichgewichts zwischen positiven und negativen Regulatoren des Gefäßwachstums. Gegenwärtig sind mehr als 50 proangiogene und antiangiogene Faktoren bekannt, die in diesem komplexen System eine Rolle spielen können (Harris, 1997).

Hauptsächlicher Zielort dieser Faktoren sind die ansonsten ruhenden Endothelzellen benachbarter Blutgefäße im umliegenden Wirtsgewebe des Tumors. Endothelzellen gehören zu den am längsten lebenden Zellen im Organismus außerhalb des zentralen Nervensystems. In einem normalen adulten Blutgefäß befindet sich nur eine von 10.000

Zellen in einer mitogenen Phase (Engerman *et al.* 1967; Jaffe, 1987). Angiogene Stimulation führt zu einer enormen Steigerung der Proliferationsrate der Endothelzelle. Die Replikationsrate liegt nun nahe der von Knochenmarks-Stammzellen bekannten Rate und beträgt bis zu 6×10^9 Zellteilungen pro Stunde (Hobson & Denekamp, 1984; Denekamp, 1992; Denekamp, 1993). Dies führt zu zahlreichen Veränderungen in den Endothelzellen, die ihnen ermöglichen, innerhalb der extrazellulären Matrix in Richtung des angiogenen Stimulus zu wandern.

Die Loslösung aus dem Zellverband würde normalerweise als eine Art Schutzmechanismus den Tod der Endothelzellen durch Apoptose bedeuten (Carson & Ribeiro, 1993; Ruoslahti & Reed, 1994). Dies wird jedoch dadurch verhindert, daß die Endothelzellen an ihrer Oberfläche die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ exprimieren (Friedlander *et al.* 1995; Brooks, 1996) (Abb. 1C; Seite 4). Durch Bindung dieser Integrine an Bestandteile der extrazellulären Matrix, welche die Aminosäuresequenz Arginin, Glycin und Aspartat (RGD) aufweisen (Cheresh, 1987), wird wie eine Art „Anker“ die Migration der Endothelzellen in Richtung Tumor ermöglicht, ohne daß diese dabei durch Apoptose zugrunde gehen (Brooks *et al.* 1994a; Stromblad *et al.* 1996). Die zusätzliche Interaktion der exprimierten Integrine mit der Matrix Metalloproteinase MMP-2 ermöglicht eine strukturelle Veränderung der extrazellulären Matrix und erleichtert dadurch die Invasion der ausprossenden Blutgefäße im umliegenden Wirtsgewebe des Tumors (Brooks *et al.* 1996; Brooks *et al.* 1998). Haben die Tumorzellen den Anschluß an das Blutgefäßsystem gewonnen, ist die Versorgung mit Nährstoffen gesichert und das Tumorwachstum kann ungehindert fortschreiten (Abb. 1E; Seite 4).

3.1.1. Einfluß der Integrin-Blockade auf das Tumorwachstum

Bei unseren Versuchen war das Tumorwachstum der Kontrollgruppe nahezu exponentiell. Damit zeigte das subkutan implantierte A-Mel-3 in der Kontrollgruppe einen Wachstumsverlauf, der vergleichbar mit früheren Untersuchungen ist (Gamarra *et al.* 1993; Dellian, 1993; 1996a). In der Gruppe, die mit dem Integrin-Antagonisten

behandelt wurde, trat dagegen eine Verzögerung des Tumorwachstums ein, die ab Tag sieben nach Tumorzellimplantation signifikant war. Die Ursache dafür liegt am ehesten in der Inhibierung des Integrins, was wiederum zu einer Hemmung der Tumorangiogenese und somit zu einer schlechteren Blutversorgung der Tumoren der RGD-Gruppe führte. Das verzögerte Wachstum der Blutgefäße bewirkte in den behandelten Tumoren eine Mangelversorgung mit Nährstoffen und somit ein verzögertes Wachstum.

Das verzögerte Tumorwachstum unter Behandlung mit dem RGD-Peptid läßt sich auch bei den Tumoren in der Rückenhautkammer beobachten. Erste signifikante Unterschiede finden sich hier am Tag neun nach Tumorzellimplantation, also zwei Tage später als bei den subkutanen Tumoren. Der Grund dafür dürfte im unterschiedlichen Wachstumsverhalten des Tumors in der Kammer gegenüber den subkutan wachsenden Tumoren liegen. Während die subkutanen Tumoren von Beginn an in dreidimensionaler Richtung wachsen können und somit früh von der Angiogenese abhängig sind, findet in der Kammer zunächst eine flächige Ausdehnung des Tumors statt. Die kürzere Strecke, welche die Nährstoffe dabei zu überwinden haben, ermöglicht den Tumorzellen zunächst über längere Zeit die Ernährung durch Diffusion. Unterstützung findet diese Annahme durch die intravitalmikroskopischen Untersuchungen. Schon am Tag drei nach Tumorzellimplantation fanden sich signifikante Unterschiede der funktionellen Gefäßdichte zwischen den Gruppen. Das Tumorwachstum in der Kammer war aber erst am Tag neun signifikant verzögert. Daraus läßt sich rückschließen, daß –modellbedingt– die Tumoren in der Kammer erst zu einem späteren Zeitpunkt von der Angiogenese abhängig waren als die subkutan wachsenden Tumoren.

Anhand der Ergebnisse des Tumorwachstums konnte aufgrund theoretischer Überlegungen die Mechanismen von Integrin und RGD-Peptid-Antagonist betreffend, sowie aufgrund der Literaturbefunde argumentiert werden, daß der wachstumsverzögernde Effekt tatsächlich durch Hemmung der Angiogenese bedingt war. Eine Untersuchung dieses potentiellen Mechanismus erfolgte später durch die Experimente in der transparenten Rückenhautkammer.

Die zahlreichen Funktionen verschiedener Integrine lassen noch eine weitere Interpretation der erhaltenen Ergebnisse zu (Hynes, 1992). Es konnte gezeigt werden, daß maligne Zellen, die sich in der extrazellulären Matrix ausbreiten, an ihrer Oberfläche Integrine exprimieren, um Kontakt zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix herzustellen. Diese Bindung verhinderte den Untergang der Krebszellen durch Apoptose (Ruoslahti & Reed, 1994). Verschiedene Zelllinien humaner Melanomzellen exprimieren in unterschiedlicher Weise die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ (Wayner *et al.* 1991). Außerdem korreliert die Expression von $\alpha_v\beta_3$ mit dem Tiefenwachstum des malignen kutanen Melanoms (Albelda *et al.* 1990). Spezifische Antikörper gegen diese Integrine blockierten *in vitro* die Adhäsion der Zellen an Vitronectin, ein Bestandteil der extrazellulären Matrix und verhinderten die Ausbreitung der Zellen in dreidimensionalen Kollagengel-Essays (Montgomery *et al.* 1994). Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, daß sich auch *in vivo* das Wachstum des malignen Melanoms mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und durch zyklische RGD-Peptide angiogeneseunabhängig hemmen läßt (Petitclerc *et al.* 1999; Mitjans *et al.* 2000).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß auch in der hier vorliegenden Studie das RGD-Peptid nicht nur einen hemmenden Effekt auf die Tumorangiogenese hatte, sondern möglicherweise auch auf die Tumorzellen selbst. Eigene Untersuchungen des A-Mel-3 zeigten in der Tat, daß das Integrin $\alpha_v\beta_3$ in geringem Ausmaß auf der Oberfläche der Zelle exprimiert wird. Somit läßt sich feststellen, daß aus den Ergebnissen des Tumorwachstums nicht darauf geschlossen werden kann, ob der wachstumsverzögernde Effekt allein durch die Hemmung der Tumorangiogenese bedingt war. Weitere Aufschlüsse darüber konnten nur die intravitalmikroskopischen Untersuchungen bringen, die jedoch deutlich werden ließen, daß der überwiegende Effekt durch Hemmung der Angiogenese bedingt ist. Ein gewisser zusätzlicher Effekt auf die Wachstumshemmung kann jedoch trotzdem nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

3.2. Rolle der Angiogenese bei der Tumormetastasierung

Untersucht wurde auch, ob die Behandlung mit dem RGD-Peptid einen Einfluß auf die Metastasierung hat. Das Auftreten von Metastasen zählt seit jeher zu dem am meisten bedrohlichen Aspekt im onkogenen Prozeß (Fidler & Ellis, 1994). Diese Einschätzung scheint gerechtfertigt, denn bei ca. 50% aller Patienten kann die chirurgische Entfernung des Primärtumors nicht kurativ sein, da zu diesem Zeitpunkt bereits Metastasen entstanden sind (Sugarbaker & Ketcham, 1977; Fidler & Balch, 1987). Mehr noch, die Entfernung der Primärgeschwulst scheint häufig erst recht das Auftreten von Metastasen zu begünstigen (Holmgren *et al.* 1995; Folkman, 1995a), da der Primärtumor möglicherweise durch Ausschüttung antiangiogener Substanzen (Angiostatin, Endostatin, etc.) das Wachstum von Metastasen unterdrückt (Sckell *et al.* 1998; Guba *et al.* 2001).

Um erfolgreich Tochtergeschwülste in Entfernung vom Primärtumor zu etablieren, haben die Tumorzellen eine Reihe von Barrieren zu überwinden (Fidler *et al.* 1978; Zetter, 1990): Sie müssen das lokale Gewebe durchwandern, sich Zugang zum Gefäßsystem verschaffen, und bei der hämatogenen Streuung im systemischen Kreislauf der Immunabwehr entgehen (Netland & Zetter, 1984; Nicolson, 1988). Haben die Tumorzellen ihr Zielorgan erreicht müssen dort Voraussetzungen geschaffen werden, die ein Wachstum der Metastasen ermöglichen. (Weidner *et al.* 1991; Weinstat-Saslow & Steeg, 1994). Angiogenese scheint dabei sowohl am Anfang, wie auch am Ende dieser Kaskade beteiligt zu sein. Liotta und Mitarbeiter konnten tierexperimentell nachweisen, daß Tumorzellen so gut wie gar nicht in das Gefäßsystem eindringen, solange der Primärtumor nicht vaskularisiert war. Nachdem jedoch die Neovaskularisierung eingesetzt hatte, fanden sich stets Tumorzellen im Blutkreislauf (Liotta *et al.* 1976; 1980). In diesen Studien korrelierte außerdem die Anzahl der gestreuten Tumorzellen generell mit der Gefäßdichte im Primärtumor, als auch mit der Anzahl der später beobachteten Lungenmetastasen. Nicht nur tierexperimentell konnte dargestellt werden, daß die Metastasierung von der Tumorangiogenese abhängt. Noel Weidner gehörte zu den Ersten, die beim invasiven Brustkrebs über eine Korrelation zwischen dem Grad der Neovaskularisierung des Primärtumors und der folgenden Entwicklung von Metastasen berichtet hatte (Weidner *et al.* 1991). Die Untersucher

etablierten den Begriff des „Angiogenen Index“, d.h. Anzahl von Gefäßen pro mikroskopischem Gesichtsfeld in einem histologischen Schnitt. Weitere Untersuchungen folgten und wiesen nach, daß auch ein Zusammenhang zwischen Gefäßdichte im Primärtumor und dem therapeutischen Outcome, dem Überleben und der Mortalität besteht (Gasparini *et al.* 1994). Mittlerweile konnten diese Erkenntnisse nicht nur beim Brustkrebs, sondern auch für eine Vielzahl von anderen Tumorarten bestätigt werden (Macchiarini *et al.* 1992; Weidner, 1995; Gasparini *et al.* 1996). Hat der Primärtumor Anschluß an das Blutgefäßsystem gefunden und somit die Möglichkeit zur Verbreitung von Tumorzellen, können diese, abhängig von Tumorart und Zielgewebe, ebenfalls zunächst für lange Zeit als Mikrometastasen unauffällig bleiben (Holmgren *et al.* 1995). Mit beginnendem Wachstum werden jedoch auch die Mikrometastasen von einer ausreichenden Blutzufuhr abhängig. Sie scheinen nun ähnliche Mechanismen zu entwickeln, wie der Primärtumor (Fidler & Ellis, 1994; Folkman, 1995b).

3.2.1. Einfluß der Integrin-Blockade auf die Metastasierung

Bei den Tieren, die mit dem RGD-Peptid behandelt wurden, kam es zu einem späteren Auftreten von Metastasen als bei den Tieren in der Kontrollgruppe. 11 Tage nach Tumorzellimplantation waren noch bei der Hälfte der Tiere aus der Verum Gruppe keine tastbar vergrößerten Lymphknoten zu palpieren. Zu diesem Zeitpunkt waren dagegen bereits bei allen Tieren aus der Kontrollgruppe die Lymphknoten als Zeichen der Metastasierung vergrößert. Aufgrund der oben angestellten Überlegungen ist es daher sehr wahrscheinlich, daß die Therapie mit dem Integrin-Antagonisten zunächst im Primärtumor eine effektive Hemmung der Neovaskularisierung bewirkte. Somit erlangten die Tumorzellen in der RGD-Gruppe erst später einen Anschluß an das Gefäßsystem und somit auch erst verzögert die Möglichkeit, systemisch zu streuen.

Ein zweiter Faktor mag zum verzögerten Auftreten und Wachstum der Metastasen beigetragen haben: Während die Metastasen der Kontrollgruppe an ihrem Zielort ungehindert durch Induktion der Angiogenese wachsen konnten, standen die Metastasen

der Verum-Gruppe ebenfalls unter dem Einfluß des RGD-Peptids. Dies hemmte das Wachstum auch ihrer Blutgefäße und führte dadurch zum verzögerten Auftreten von Metastasen in den Lymphknoten.

3.3. Untersuchungen in der transparenten Rückenhaulammer

3.3.1. Pathophysiologie der Tumormikrozirkulation

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie am transparenten Rückenhaulammermodell wurde untersucht, inwieweit der wachstumsverzögernde Effekt durch das RGD-Peptid auf die Tumorangio-genese, respektive die Mikrozirkulation zurückzuführen ist. Die Tumormikrozirkulation des A-Mel-3 wurde am Institut für Chirurgische Forschung begleitet von histologischen und elektronenmikroskopischen Studien eingehend untersucht (Endrich & Messmer, 1981; Endrich *et al.* 1982a; Oda *et al.* 1984; Hammersen *et al.* 1985; Endrich *et al.* 1988a; 1988b; Abels *et al.* 1997). Im Kontext mit anderen Untersuchungen (Jain, 1988) kann in Abhängigkeit von Wachstumsstadium und Art des Tumors die Mikrozirkulation wie folgt charakterisiert werden:

In frühen Stadien des Tumorwachstums wachsen aus Venolen des umliegenden Wirtsgewebes Gefäßsprossen in den Randbereich des Tumors ein (Endrich *et al.* 1988b). Mit fortschreitender Angiogenese bildet sich zunehmend ein Gefäßnetz aus, welches eine chaotische Architektur mit Gefäßaussackungen, Gefäßdurchmesser-sprüngen und zahlreichen Gefäßschleifen, Spiralen und Anastomosen zeigt. Im Verhältnis zur Tumorzellproliferation erweist sich die Gefäßneubildung ineffizient. Die Gefäßwände sind durch ein Endothelzellödem und durch Endotheldefekte gekennzeichnet (Dvorak *et al.* 1988; 1999). Dies bedingt eine gesteigerte Permeabilität für Makromoleküle. Der Interkapillarabstand vergrößert sich bis hin zu Strecken, die zur Versorgung der abhängigen Tumorzellen per diffusionem zu groß sind. In den zentralen Tumorbereichen wird die Versorgung zunehmend schlechter und es entstehen in der Folge im Tumorzentrum Nekrosen, während in der Tumorperipherie die Neoangiogenese unbehindert fortschreitet (Goetz, 1987).

Aufgrund der breiten Endothellücken sind die Tumorgefäße für Makromoleküle vermehrt permeabel (Gerlowski & Jain, 1986). Dies führt zu einer erhöhten Konzentration von Makromolekülen im interstitiellen Raum von Tumoren und ist damit die Ursache für den gesteigerten onkotischen Druck im Tumorinterstitium im Vergleich zum Normalgewebe. (Stohrer *et al.* 2000). Der durch den transkapillären Flüssigkeitsverlust hohe Mikrohämatokrit (Goetz, 1987), der nicht mehr ausreichende Perfusionsdruck in den Gefäßen und der hohe interstitielle Druck verschlechtern die Versorgung der zentralen Tumorregionen. Die daraus resultierende Hypoxie führt zu zentralen Nekrosen, während im Tumorrandbereich die Tumorzellproliferation und Neoangiogenese unbehindert fortschreitet (Netti *et al.* 1996). Der erhöhte interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP), die Hämatokonzentration und die Bildung von zentralen Nekrosen mit Abnahme der Gefäßdichte ist ein bekanntes Problem im onkogenen Prozeß und stellt eine Barriere für die Zufuhr von Krebstherapeutika dar (Roh *et al.* 1991; Leunig *et al.* 1992a; Less *et al.* 1992).

3.3.2. Angiogenese in der Kontrollgruppe

Funktionelle Gefäßdichte, Erythrozytenfließgeschwindigkeit, Gefäßdurchmesser und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion waren die Parameter, welche gemessen wurden um die Tumormikrozirkulation unter Behandlung mit dem RGD-Peptid zu beschreiben. Dabei wird das Ausmaß der Tumorangiogenese mit der funktionellen Gefäßdichte quantifiziert (Dellian *et al.* 1996b). Am dritten Tag nach Tumorzellimplantation war, bei konstant bleibenden Gefäßdurchmessern, die funktionelle Gefäßdichte und die Erythrozytenfließgeschwindigkeit der Kontrollgruppe bereits signifikant gegenüber der RGD-Gruppe erhöht. Während die Gefäßdichte ihr Maximum bereits am Tag fünf erreicht hat, steigt die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten weiter bis Tag neun an und nimmt bis zum Tag 13 tendentiell wieder ab. Obwohl der Tumor weiter wächst, fällt die funktionelle Gefäßdichte kontinuierlich bis zum Tag 13 nach Tumorzellimplantation ab. Diese, im Tumor „physiologische“ Abnahme der Gefäßdichte in der späteren Wachstumsphase, wurde für das A-Mel-3 bereits von

Endrich und Goetz beschrieben (Endrich *et al.* 1982a; Goetz, 1987) und stellt eine bereits lange bekannte (Young *et al.* 1950) und intensiv untersuchte Tatsache dar, die aus dem speziellen, oben besprochenen Tumormikromilieu resultiert.

3.3.3. Effekt der Behandlung mit dem RGD-Peptid auf die Angiogenese

Berücksichtigt man die oben genannten Eigenheiten des Tumormikromilieues, so sind die in dieser Studie gefundenen Ergebnisse bemerkenswert: Die funktionelle Gefäßdichte und die Erythrozytenfließgeschwindigkeit sind während des frühen Tumorwachstums in der RGD-Gruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Erst am Tag neun nach Tumorzellimplantation erreicht die Gefäßdichte der RGD-Gruppe ihr Maximum, während die Kontrollgruppe dieses schon am Tag fünf erreichte. Die Behandlung mit dem RGD-Peptid bewirkte also schon zu einem frühen Zeitpunkt eine deutliche Hemmung der Angiogenese. Zahlreiche andere Untersuchungen, die verschiedene andere antiangiogenetische Substanzen untersuchten und die Gefäße u.a. mittels der Methode von Weidner quantifizierten (Weidner, 1995), wiesen unter antiangiogenetischer Therapie ebenfalls ein vermindertes Gefäßwachstum nach (Harris, 1997). Bemerkenswert in der vorliegenden Studie ist aber, daß die funktionelle Gefäßdichte in der RGD-Gruppe zu den späteren Meßzeitpunkten nicht abnimmt. Gegen die Möglichkeit, daß die Behandlung eventuell unwirksam wurde oder nachgelassen hat, spricht jedoch die Tatsache, daß es in der RGD-Gruppe eben nicht wie in der Kontrollgruppe zu dem „physiologischen“ Abfall der Gefäßdichte kommt, ein Effekt also noch vorhanden sein sollte, bzw. ein nachlassender Effekt ausgeschlossen werden kann. Zudem war das Tumorwachstum sowohl in der Rückenhautkammer als auch subkutan noch zu späteren Zeitpunkten verzögert. Die fehlende, „physiologische“ Abnahme der funktionellen Gefäßdichte, die unter der antiangiogenetischen Therapie beobachtet wurde, dürfte also in Beziehung zum verzögerten Tumorwachstum stehen. Zu überlegen ist somit, welchen Einfluß die Behandlung mit dem RGD-Peptid auf das Tumormikromilieu oder den Tumor hatte, so daß es zum späteren Zeitpunkt nicht zum

erwartenden Abfall der Gefäßdicke kam. Dazu lassen sich drei Überlegungen diskutieren:

I) Tumorwachstum und Angiogenese waren in der RGD-Gruppe insgesamt verzögert. Die „kritische Tumorgröße“, von der an es in der Kontrollgruppe ab Tag fünf zur „physiologischen“ Abnahme der funktionellen Gefäßdicke kam, wird aber in der RGD-Gruppe durch die antiangiogenetische Therapie erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht. Dies wäre dann zu einem Zeitpunkt, der sich der Beobachtung in der Rückenhautkammer entzieht, also mehr als 13 Tage nach Tumorzellimplantation.

II) Das verwendete RGD-Peptid wurde als hochselektiver Antagonist für das Integrin $\alpha_v\beta_3$ entwickelt (Dechantsreiter *et al.* 1999). Einige neuere Untersuchungen lassen jedoch vermuten, daß das Integrin $\alpha_v\beta_3$ nicht der einzige Integrinrezeptor ist, der während der Angiogenese eine Schlüsselposition einnimmt.

Senger und Mitarbeiter konnten in kollagenreichen Matrix-Gel-Essays zeigen, daß Endothelzelladhäsion an Kollagen auch über die Integrine $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ vermittelt werden kann, wenn sie mit VEGF stimuliert werden (Senger *et al.* 1997).

Friedlander *et al.* identifizierten 1995 zwei zytokinabhängige Signalwege in der Angiogenese, die von verschiedenen Integrinen abhängen, $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ (Friedlander *et al.* 1995). Sowohl in der Hornhaut des Kaninchens, wie auch in der CAM blockierten spezifische Antikörper gegen $\alpha_v\beta_3$ die durch bFGF induzierte Neoangiogenese. Keinen Effekt hatten sie auf die durch VEGF induzierte Angiogenese. Hier erbrachten dann jedoch Antagonisten gegen $\alpha_v\beta_5$ einen antiangiogenetischen Effekt. Das in unserer Untersuchung verwendete RGD-Peptid wurde als hochselektiver Antagonist gegen $\alpha_v\beta_3$ entwickelt (Dechantsreiter *et al.* 1999). Ein Effekt auf $\alpha_v\beta_5$ läßt sich jedoch nicht vollständig ausschließen. Es ist daher denkbar, daß die Hemmung von $\alpha_v\beta_3$ initial einen deutlichen Effekt auf die Tumorangiogenese ausübt, dann aber eine Kompensation über einen alternativen Weg statt findet, möglicherweise über $\alpha_v\beta_5$, auf welches das verwendete RGD-Peptid nur eine geringere Wirkung hat. Zu überlegen wäre auch, ob das Integrin $\alpha_v\beta_5$ von Anfang an eine gleichgewichtige Rolle in der Angiogenese des A-

Mel-3 einnimmt wie $\alpha_v\beta_3$. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, daß $\alpha_v\beta_5$ in der Tat entscheidend an der Angiogenese von Tumoren beteiligt ist (Erdreich-Epstein *et al.* 2000; Kumar *et al.* 2000; 2001). Aufgrund der Selektivität des RGD-Peptids ließe sich so erklären, warum es nicht zu einer vollständigen Verhinderung des Tumorwachstums und der Metastasierung kommt und somit auch die „physiologische“ Abnahme der Gefäßdichte in der RGD-Gruppe erst zeitlich verzögert zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet.

Daß die bislang angenommene Schlüsselposition des Integrins $\alpha_v\beta_3$ im Rahmen der Angiogenese neu diskutiert werden muß, zeigen auch Untersuchungen von Bader und Mitarbeitern. Ihnen gelang es, Knockoutmäuse ohne das α_v -Integrin zu züchten (Bader *et al.* 1998). Der Großteil der Tiere starb vor oder kurz nach der Geburt. Todesursache waren extensive Blutungen, bedingt durch massive Gefäßabnormalitäten in Gehirn und Intestinum. Interessanterweise zeigten andere Organe weitgehend normale Blutgefäße, woraus die Autoren den Schluß zogen, daß bis zu einem gewissen Grad organspezifisch eine Kompensation für den Mangel an α_v -Integrinen, bzw. alternative Wege der Angiogenese möglich sind (Bader *et al.* 1998).

III) Es läßt sich jedoch noch ein dritter Mechanismus für die erhöhte funktionelle Gefäßdichte der RGD-Gruppe gegen Ende des Versuchszeitraumes diskutieren: Wie oben bereits erörtert, sind als Hauptgrund für die „physiologische“ Abnahme der Gefäßdichte im Tumor die erhöhte Durchlässigkeit der unreifen Gefäße für Makromoleküle, der erhöhte interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP) und der verminderte Perfusionsdruck in den Gefäßen zu sehen. Der erhöhte IFP, der verminderte Perfusionsdruck und die Abnahme der Gefäßdichte mit Nekrosebildung stellen eine „natürliche“ Barriere für die Zufuhr von Krebstherapeutika dar (Leunig *et al.* 1992b; Netti *et al.* 1995). Mangelnde Durchblutung und Hypoxie verhindern sowohl einen effizienten Antransport von Chemotherapeutika als auch die Effektivität einer Strahlentherapie (Teicher, 1994; Teicher, 1995; Weichselbaum *et al.* 1995). In den mit dem RGD-Peptid behandelten Tumoren kam es nicht zur „physiologischen“ Abnahme der Gefäßdichte. Eine Erklärung dafür wäre, daß unter antiangiogenetischer Therapie das Blutgefäßwachstum und damit auch das Tumorwachstum insgesamt langsamer sind.

Die Gefäße hätten dadurch die Möglichkeit besser auszureifen, bevor sie durch ihre eigene Unreife wieder zugrunde gehen. Somit würden die Mechanismen, die während des Tumorwachstums zu Abnahme der Gefäßdichte führen weniger ausgeprägt sein. Unterstützung für diese Überlegung stammt aus Untersuchungen, in denen antiangiogenetische Substanzen mit Chemotherapeutika (Kakeji & Teicher, 1997) oder ionisierender Strahlung kombiniert wurden (Mauceri *et al.* 1998; Hanna *et al.* 2000). Die Kombinationstherapie zeigte einen stärkeren Effekt auf das Tumowachstum, als wenn die verschiedenen Substanzen einzeln verabreicht wurden. Dies war einerseits durch den antiangiogenetischen Effekt auf die Endothelzellen bedingt und andererseits dadurch möglich, daß die Agentien in weit ausgedehnteren Bereichen des Tumors besser antransportiert werden konnten als sonst üblich (Kakeji & Teicher, 1997; Gorski *et al.* 1998). Lee und Mitarbeiter konnten zeigen, daß unter antiangiogenetischer Therapie ein Anstieg des Partialdruckes für Sauerstoff (pO_2) im Tumorgewebe, bei gleichzeitigem Abfall des IFP und eine Verminderung der vaskulären Permeabilität zu beobachten ist. Trotz Hemmung des Tumorwachstums bildeten sich qualitativ hochwertigere Gefäße aus, so daß die auf die Tumoren einwirkende ionisierende Strahlung durch eine bessere Oxygenierung effektiver wirksam war (Lee *et al.* 2000).

Es kann letztlich nicht eindeutig beantwortet werden, welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist, daß zu den späteren Meßzeitpunkten in der RGD-Gruppe kein „physiologischer“ Abfall der funktionellen Gefäßdichte zu beobachten war. Unbestritten ist, daß es unter Anwendung des RGD-Peptids zu relevanten Veränderungen im Tumormikromilieu gekommen sein muß. Diese Veränderungen könnten sich als potentiell bedeutend für die antiangiogenetische Tumorthherapie herausstellen und sollten daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

3.3.4. Rolle der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Angiogenese

Angiogenese ist ein wesentlicher Vorgang im Rahmen der Granulationsgewebsbildung bei der Wundheilung, sowie bei einigen entzündlichen Krankheiten (Folkman, 1995a). Während in diesen Fällen weitgehend Einigkeit darüber herrscht, daß Leukozyten dabei eine fundamentale Rolle spielen (Yasuda *et al.* 2000; Sullivan *et al.* 2000; Lingen, 2001), wird die Rolle der Leukozyten in der Tumorangiogenese und antiangiogenetischen Therapie kontrovers diskutiert (Wu *et al.* 1992; Ferrara, 1995; Ferrara, 1996; Jain *et al.* 1996; Melder *et al.* 1996).

Die Interaktion der Leukozyten mit dem normalen mikrovaskulären Endothel wird durch Zell-Adhäsions-Moleküle (CAM) vermittelt. Die Selectine (P, L und E) und Mitglieder der IgG Superfamilie, ICAM-1 und VCAM-1 (Springer, 1994) ermöglichen den Leukozyten das Rollen und die Adhäsion an das Endothel. Die Expression der CAM's auf dem Endothel und den Leukozyten wird beeinflusst durch inflammatorische Zytokine und angiogene Wachstumsfaktoren, die vom Wirtsgewebe oder von Tumorzellen sezerniert werden (Springer, 1994; Jain *et al.* 1996). Der angiogenetische und metastatische Prozeß beim Wachstum von Tumoren beinhaltet Adhäsion, Migration und Proliferation der Tumor -und Endothelzellen. Daher besteht die Möglichkeit, daß viele der CAM's an diesen Vorgängen beteiligt sind. Fox und Mitarbeiter beschreiben eine erhöhte Expression von ICAM-3 und E-Selectin auf Tumorendothelzellen des invasiven Mamma-Karzinoms. Sie hypothetisieren, daß die CAM's dabei die Funktion haben, Leukozyten zu rekrutieren, die die Angiogenese unterstützen (Fox *et al.* 1995). Yoda *et al.* konnten zeigen, daß in einem murinen Kolon-Karzinom Modell die Produktion von proangiogenen Faktoren direkt mit der Anzahl der im Tumor infiltrierten Leukozyten korreliert (Yoneda *et al.* 1999) und die Untersuchungen von Salven *et al.* ergaben hohe Konzentrationen von VEGF in den Leukozyten von Krebspatienten (Salven *et al.* 1999). Dies läßt den Schluß zu, daß Leukozyten möglicherweise die Tumorangiogenese unterstützen, indem sie angiogenetische Wachstumsfaktoren in den Tumor transportieren.

Andererseits zeigen jedoch zahlreiche Studien, daß in Tumoren eine Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen nahezu nicht nachweisbar ist, was möglicherweise durch die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen in den Tumorgefäßen bedingt ist (Dellian *et al.* 1995; Jain *et al.* 1996). Auch nach entsprechender Stimulation wird nur ein geringer Anstieg der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Tumor beobachtet (Fukumura *et al.* 1995; Borgstroem *et al.* 1997). Griffioen *et al.* vertreten –auf der Basis ihrer Ergebnisse– die Hypothese, daß bestimmte, vom Tumor sezernierte Angiogenesefaktoren die Expression der Adhäsionsmoleküle unterdrücken, um so der Immunabwehr zu entgehen (Griffioen *et al.* 1998). Die Fähigkeit der Krebszellen, der Immunabwehr zu entgehen ist ein bekanntes Phänomen im onkogenen Prozeß.

3.3.4.1. Einfluß der Integrin-Blockade auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Vergleichbar mit anderen Untersuchungen am A-Mel-3 war auch in unserer Studie in der Kontrollgruppe nahezu keine Leukozyten-Endothelzell-Interaktion festzustellen und damit deutlich geringer als im Normalgewebe des Hamsters (Nolte *et al.* 1991; Dellian *et al.* 1995; Jain *et al.* 1996). Renard *et al.* beobachteten, daß TNF die Tumorgefäße in Melanomen zerstört und es zur verstärkten Rekrutierung von Leukozyten in den Tumorgefäßen kommt (Renard *et al.* 1994). Unter dem von Griffioen in 3.3.4. diskutierten Gesichtspunkt wäre es also denkbar, daß unter antiangiogenetischer Therapie auch die Fähigkeit des Tumors, der Immunabwehr zu entgehen unterdrückt wird. Die Anwendung des RGD-Peptids führte allerdings in unserer Untersuchung zu keinem Anstieg der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.

Die Rolle der Leukozyten in der Tumorangio-genese bleibt nach wie vor ungelöst und die kontroversen Meinungen sind höchstwahrscheinlich durch unterschiedliche Untersuchungsmethoden bedingt. Eine Übersichtsarbeit von Jain und Mitarbeitern faßt zahlreiche diesbezügliche Untersuchungen zusammen und verdeutlicht, daß die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in Tumorgefäßen sehr heterogen ist und nicht nur

in verschiedenen Tumoren variiert, sondern auch innerhalb verschiedener Regionen ein und desselben Tumors (Jain *et al.* 1996).

4. Klinische Relevanz und Ausblick

Sowohl aus theoretischer, als auch aus experimentell-praktischer Sicht stellt die antiangiogenetische Tumorthherapie mit dem RGD-Peptid in vielerlei Hinsicht eine neue, attraktive und vielversprechende Form zur Behandlung des Krebsleidens dar (Harris, 1997). Dies ergibt sich aus zahlreichen Vorteilen, die mit der Hemmung der Tumorangio-genese einhergehen:

Nicht nur solide Tumoren, sondern auch die akute –und chronische Leukämie sowie das Myelodysplastische Syndrom, sind von der Angiogenese abhängig (Folkman, 1990; Aguayo *et al.* 2000). Die Problematik der Resistenzentwicklung genetisch instabiler Tumorzellen gegen Medikamente ist bei der therapeutischen Antiangiogenese nicht gegeben, da Endothelzellen genetisch stabil sind (Keshet & Ben-Sasson, 1999).

Metastasen, die sich einer kurativen chirurgischen Therapie entziehen, sind ebenfalls von der Angiogenese abhängig und somit einer antiangiogenetische Therapie zugänglich (Fidler & Ellis, 1994).

Die konventionelle Tumorthherapie mit ionisierender Strahlung oder Zytostatika richtet sich gegen Tumorzellen in der Proliferationsphase. Tumorzellen in der G₀-Phase sind vom Zellzyklus vorübergehend ausgeschieden und entgehen der Behandlung. Die Ursache dafür ist, daß sowohl ionisierende Strahlung als auch Zytostatika ihre Wirkung hauptsächlich während verschiedener aktiver Phasen des Zellzyklus entfalten (Slapak & Kufe, 1995). Im Vordergrund steht die Schädigung der sich teilenden DNS durch Bildung von Radikalen, reaktiver Sauerstoffderivate, alkylierenden Substanzen, Antimetabolite und Mitosenhemmer. Maßgeblich für die Effektivität der Therapie ist dabei die Proliferationsrate der Zellen. Eine hohe Mitoserate der Tumorzellen begünstigt die Effektivität der Therapie. Dies beinhaltet, daß Nebenwirkungen dieser Therapie obligat sind, da viele Gewebetypen im Organismus ebenfalls einen hohen Zellumsatz aufweisen und dadurch unbeabsichtigt bedeutende Angriffspunkte für

ionisierende Strahlung und Chemotherapeutika darstellen. Myelosuppression ist der schwerwiegendste und der häufigste therapielimitierende Faktor, gefolgt von Schädigungen des Darmepithels, des lymphatischen Gewebes, der Mundschleimhaut und der Keimbahnen (Slapak & Kufe, 1995).

Wahrscheinlich ist, daß selektive angiosuppressive Medikamente eine niedrige Toxizität beinhalten: Es ist nicht zu erwarten, daß schwere Nebenwirkungen wie Knochenmarkssuppression, gastrointestinale Beschwerden oder Haarverlust auftreten, wie der Großteil der bisherigen Krebstherapeutika (Folkman, 1996). Dies liegt an der Selektivität der antiangiogenetischen Substanzen gegenüber proliferierenden Blutgefäßen, denn Endothelzellen in etablierten Gefäßen erneuern sich im Schnitt nur alle 10.000 Tage. Proliferierende Endothelzellen haben dagegen während der Tumorangiose einen Teilungszyklus von ca. fünf Tagen (Engerman *et al.* 1967; Hobson & Denekamp, 1984; Jaffe, 1987; Denekamp, 1993). Denkbar wäre, daß es unter antiangiogenetischer Therapie zu Wundheilungsverzögerungen (Brem & Folkman, 1993) und Fertilitätsstörungen kommt (Ferrara *et al.* 1998). Besondere Vorsicht ist im Rahmen der Vaskulogenese, also während der Blutgefäßbildung im Embryo geboten. Thalidomid, ehemals als Schlafmittel unter dem Namen „Contergan“ bekannt, ist ein potenter Inhibitor der Angiogenese. Die bei Einnahme in der Schwangerschaft eingetretenen Schäden der Feten sind wahrscheinlich die Folge einer Inhibierung der Vaskulogenese (D'Amato *et al.* 1994).

Mit den Endothelzellen als Zielstruktur erfaßt man eine normalerweise genetisch stabile Zelle. Genetisch instabile Zellen, wie die Tumorzellen, entwickeln im Rahmen einer zytostatischen Therapie häufig Resistenzen, was dann den Endpunkt einer Krebstherapie bedeutet. Sowohl experimentelle Untersuchungen, als auch bereits laufende klinische Prüfungen der Phase I und II zeigten keine Resistenzentwicklung unter antiangiogenetischer Therapie (Boehm *et al.* 1997; Kerbel, 1997; Brem, 1999). Häufiger Kritikpunkt ist, daß eine antiangiogenetische Therapie für sehr lange Zeit, mitunter sogar lebenslang, durchgeführt werden müßte, da sich die Tumoren im frühen Stadium auch durch Diffusion ernähren können. Sicherlich stellt die antiangiogenetische Therapie vom theoretischen Aspekt her eine chronische Therapieform dar. Doch Untersuchungen zeigten, daß nach mehreren Zyklen

antiangiogenetischer Therapie kein erneutes Tumorwachstum zu beobachten war (O'Reilly *et al.* 1996; O'Reilly *et al.* 1997).

Obgleich sich zur Zeit zahlreiche Substanzen in klinischen Prüfungen der Phase I und II befinden, um ihren Effekt als Monotherapeutikum zu evaluieren, so ist schon jetzt abzusehen, daß sie den Effekt bisheriger Therapien steigern können. Sowohl die Kombination mit Chemo-, als auch mit Strahlentherapie verbesserte deutlich den therapeutischen Effekt (Kakeji & Teicher, 1997; Mauceri *et al.* 1998; Gorski *et al.* 1998; Hanna *et al.* 2000). Aber auch die Kombination verschiedener Hemmstoffe der Angiogenese untereinander geht mit einer gesteigerten Wirkung einher (Brem *et al.* 1993; Lode *et al.* 1999).

In einer Reihe von nicht-neoplastischen Krankheiten ist die Angiogenese ein am Pathomechanismus entscheidend beteiligter Faktor. Es zeigt sich, daß dabei ähnliche Prozesse ablaufen, wie in der Tumoriangiogenese (Folkman, 1995a). Untersuchungen demonstrieren, daß sich antiangiogenetisch wirksame Substanzen auch bei rheumatoider Arthritis, diabetischer Retinopathie, Psoriasis und beim Kaposi-Sarkom erfolgreich einsetzen lassen könnten (Pluda, 1997).

Das in dieser Studie verwendete, neuartige RGD-Peptid erweitert durch seine speziellen Charaktereigenschaften die oben beschriebenen Vorteile der antiangiogenetischen Therapie: Aufgrund der kleinen Molekülgröße des RGD-Peptids ist davon auszugehen, daß es zu keinen immunogenen Reaktionen kommt, wie dies häufig ein Problem bei der Behandlung mit Antikörpern darstellt. Seine, wie in 1.2.3. diskutierte hohe Spezifität für das α_v -Integrin macht es wahrscheinlich, daß keine Beeinträchtigung der Funktion anderer Integrine zu erwarten ist. Zudem ist es vergleichsweise einfach und kostengünstig in ausreichenden Mengen zu synthetisieren, was bei der zunehmenden Anzahl von Krebserkrankungen wirtschaftlich von Bedeutung sein dürfte. Zukünftige Studien werden noch zu prüfen haben, ob sich das RGD-Peptid in seinen pharmakologischen Eigenschaften noch weiter verbessern läßt, so daß durch weitere Veränderung der zyklischen Ringkonformation die Halbwertszeit bzw. die Affinität am Rezeptor verlängert, oder eine ausreichende Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe erzielt werden kann. Hierbei dürfte die Peptid-Rezeptor-Kinetik zum Integrin $\alpha_v\beta_5$ von

besonderem Interesse sein. Aus diesen Erkenntnissen könnten sich neue Möglichkeiten für eine noch effektivere Therapie ergeben. So wäre zu prüfen, ob durch eine Dosissteigerung, kontinuierliche Applikation, oder durch Kombination mit einem Inhibitor des Integrins $\alpha_v\beta_5$ eine Steigerung des antiangiogenetischen Effektes möglich ist.

Nachdem erstmals in den 1970er und 1980er Jahren einzelne Forscher Tumorgefäße als Angriffspunkt für eine spezifische Krebstherapie vorschlugen, ist das Interesse an dieser neuen Therapieform in den letzten Jahren sprunghaft gestiegen (Cohen, 1999; Brower, 2000). In zahlreichen experimentellen Studien konnte die Richtigkeit und Wirksamkeit dieses neuen therapeutischen Konzeptes eindrucksvoll belegt werden (Brem, 1999). Ca. 20 antiangiogenetische Wirkstoffe befinden sich bereits in der klinischen Prüfung. (Phase I, II und III). Gegenwärtig befindet sich das RGD-Peptid EMD 121974 in klinischen Studien der Phasen I und II, unterstützt durch das National Institute of Health und das National Cancer Institute der USA. Untersucht wird der Effekt auf das Kaposi-Sarkom und auf das anaplastische Gliom, ein Tumor, der hohe angiogenetische Aktivität besitzt (Brem, 1999).

E. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen, ist die Voraussetzung für Wachstum und Metastasierung solider Tumoren. In diesem Prozeß migrieren aktivierte Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix mit dem Ziel, ein neues, den Tumor versorgendes Gefäßsystem zu etablieren. Die α_v -Integrine vermitteln dabei den Kontakt der Endothelzellen zu Proteinen der extrazellulären Matrix, welche die Aminosäuresequenz Arginin, Glycin und Aspartat (RGD) aufweisen. Durch diese Bindung wird das Überleben der emigrierten Endothelzellen ermöglicht. Eine Inhibition der α_v -Integrine stellt somit eine potentielle Möglichkeit zur antiangiogenetischen Therapie von Tumoren dar. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, welchen Effekt die Inhibition der α_v -Integrine durch ein zyklisches RGD-Peptid auf die Phänomene Angiogenese, Mikrozirkulation, Wachstum und Metastasierung eines soliden Tumors *in vivo* ausübt.

Die Untersuchungen erfolgten am amelanotischen Melanom A-Mel-3 des syrischen Goldhamsters. Die Wirkung des zyklischen RGD-Peptids auf Angiogenese und Mikrozirkulation wurde am Modell der transparenten Rückenhautkammer evaluiert. In diese Hautkammer wurden Zellen des A-Mel-3 implantiert und die Tiere randomisiert zwei Versuchsgruppen zugeteilt: Eine Gruppe wurde mit dem zyklischen RGD-Peptid behandelt, die Kontrollgruppe mit einem inaktivem Peptid. Die Therapie erfolgte durch intraperitoneale Injektion der Substanzen alle 12 Stunden über einen Zeitraum von 13 Tagen, beginnend einen Tag nach Implantation der Tumorzellen. Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurden funktionelle Gefäßdichte, Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten, Gefäßdurchmesser, sowie Leukozyten-Endothelzell-Interaktion an den Tagen 3, 5, 9 und 13 des Tumorwachstums quantifiziert. Dazu erfolgte die Darstellung der Tumorblutgefäße durch intravenöse Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran, Leukozyten wurden *in vivo* durch Gabe von Rhodamin markiert.

In einer zweiten Versuchsreihe evaluierten wir den Effekt des RGD-Peptids auf Wachstum und Metastasierung des subkutan implantierten amelanotischen Hamstermelanoms. Die Therapie erfolgte wiederum durch intraperitoneale Injektion des Verum- bzw. Kontrollpeptids alle 12 Stunden ab dem ersten Tag des Tumorwachstums. Zur Berechnung des Tumolvolumens wurde Länge, Breite und Höhe des Tumors gemessen; durch Palpation der axillären und inguinalen Lymphknoten die Ausprägung von Metastasen geprüft.

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen führten zu folgenden Resultaten: Die funktionelle Gefäßdichte sowie die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten waren in der mit dem RGD-Peptid behandelten Gruppe an Tag 3 signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert. Zu diesem Meßzeitpunkt waren in der behandelten Gruppe erst wenige frühe Gefäßsprossen aufzufinden, die Tumoren der Kontrollgruppe zeigten demgegenüber bereits ein funktionierendes Blutgefäßsystem. Im weiteren Verlauf erreichte die funktionelle Gefäßdichte der Kontrolltumoren ihr Maximum am Tag fünf nach Tumorzellimplantation, während unter Therapie mit dem RGD-Peptid eine vergleichbar hohe funktionelle Gefäßdichte erst später, am Tag neun, beobachtet wurde. Die Messung von Gefäßdurchmessern und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Die Inhibition der α_v -Integrine hatte einen Einfluß auf das Wachstum der Tumoren: Während die subkutanen Tumoren bei den Kontrolltieren ein nahezu exponentielles Wachstum zeigten, konnte bei den Tieren, die mit dem RGD-Peptid behandelt wurden, eine signifikante Retardierung des Tumorwachstums beobachtet werden. Darüber hinaus führte die Behandlung mit dem RGD-Peptid zu einer deutlich verzögerten Metastasierung der Tumoren. Somit hatte die antiangiogenetische Therapie mit dem zyklischem RGD-Peptid einen bemerkenswerten Erfolg auf Wachstum und Metastasierung des extrem schnell wachsenden, hochmalignen Tumors. Das zyklische RGD-Peptid ist damit ein aussichtsreicher Kandidat für den klinischen Einsatz zur antiangiogenetischen Therapie von Tumoren.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Abels, C., Szeimies, R.M., Steinbach, P., Richert, C. & Goetz, A.E. (1997) Targeting of the tumor microcirculation by photodynamic therapy with a synthetic porphycene. *J.Photochem.Photobiol.B.* **40**, 305-312.
- Aguayo, A., Kantarjian, H., Manshouri, T., Gidel, C., Estey, E., Thomas, D., Koller, C., Estrov, Z., O'Brien, S., Keating, M., Freireich, E. & Albitar, M. (2000) Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* **96**, 2240-2245.
- Albelda, S.M., Mette, S.A., Elder, D.E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M. & Buck, C.A. (1990) Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.* **50**, 6757-6764.
- Algire, G.H. (1943) An adaption of the transparent-chamber technique to the mouse. *J.Natl.Cancer Inst.* **4**, 1-11.
- Ali, F.E., Calvo, R.R., Romoff, T.T., Samanen, J.M., Nichols, A.J. & Store, B. (1990) Structure-Activity studies towards the improvement of antiaggregatory activity of RGDS. In: Rivier, J.E. & Marshall, G.R., (Eds.) *Peptides: Chemistry, Structure and Biology*, Seiten 94-96. Leiden (The Netherlands): ESCOM Science
- Asaishi, K., Endrich, B., Goetz, A.E. & Messmer, K. (1981) Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res.* **41**, 1898-1904.
- Atherton, A. & Born, G.V. (1972) Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls. *J.Physiol.(Lond)* **222**, 447-474.

- Auerbach, W. & Auerbach, R. (1994) Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol.Ther.* **63**, 265-311.
- Aumailley, M., Gurrath, M., Muller, G., Calvete, J., Timpl, R. & Kessler, H. (1991) Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.* **291**, 50-54.
- Bach, A., Eyermann, C., Gross, J., Bower, M., Harlow, R., Weber, P. & DeGrado, W. (1994) Structural studies of a family of high affinity ligands for GPIIb/IIIa. *J.Am.Chem.Soc.* **116**, 3207-3219.
- Bader, B.L., Rayburn, H., Crowley, D. & Hynes, R.O. (1998) Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* **95**, 507-519.
- Baker, M. & Wayland, H. (1974) On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc.Res.* **7**, 131-143.
- Bayless, K.J., Salazar, R. & Davis, G.E. (2000) RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. *Am.J.Pathol.* **156**, 1673-1683.
- Benjamin, L.E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D. & Keshet, E. (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J.Clin.Invest.* **103**, 159-165.
- Bhatt, D.L. & Topol, E.J. (2000) Current role of platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes. *JAMA* **284**, 1549-1558.
- Boehm, T., Folkman, J., Browder, T. & O'Reilly, M.S. (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* **390**, 404-407.

- Borgstroem, P., Hillan, K.J., Sriramarao, P. & Ferrara, N. (1996) Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res.* **56**, 4032-4039.
- Borgstroem, P., Hughes, G.K., Hansell, P., Wolitsky, B.A. & Sriramarao, P. (1997) Leukocyte adhesion in angiogenic blood vessels. Role of E-selectin, P-selectin, and beta2 integrin in lymphotoxin-mediated leukocyte recruitment in tumor microvessels. *J.Clin.Invest.* **99**, 2246-2253.
- Brem, H. & Folkman, J. (1993) Analysis of experimental antiangiogenic therapy. *J.Pediatr.Surg.* **28**, 445-450.
- Brem, H., Gresser, I., Grosfeld, J. & Folkman, J. (1993) The combination of antiangiogenic agents to inhibit primary tumor growth and metastasis. *J.Pediatr.Surg.* **28**, 1253-1257.
- Brem, S. (1999) Angiogenesis and Cancer Control: From Concept to Therapeutic Trial. *Cancer Control.* **6**, 436-458.
- Brem, S.S., Zagzag, D., Tsanaclis, A.M., Gately, S., Elkouby, M.P. & Brien, S.E. (1990) Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *Am.J.Pathol.* **137**, 1121-1142.
- Brooks, P.C. (1996) Role of integrins in angiogenesis. *Eur.J.Cancer* **32a**, 2423-2429.
- Brooks, P.C., Clark, R.A. & Cheresh, D.A. (1994b) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* **264**, 569-571.
- Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reissfeld, R.A., Hu, T., Klier, G. & Cheresh, D.A. (1994a) Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **79**, 1157-1164.

- Brooks, P.C., Silletti, S., von Schalscha, T.L., Friedlander, M. & Cheresh, D.A. (1998) Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* **92**, 391-400.
- Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler Stevenson, W.G., Quigley, J.P. & Cheresh, D.A. (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* **85**, 683-693.
- Brower, V. (2000) Fight for reputation. Judah Folkman counter-sued Abbott in the legal battle over kringle 5. *EMBO Rep.* **1**, 301-302.
- Bruck, R., Hershkoviz, R., Lider, O., Shirin, H., Aeed, H. & Halpern, Z. (1997) The use of synthetic analogues of Arg-Gly-Asp (RGD) and soluble receptor of tumor necrosis factor to prevent acute and chronic experimental liver injury. *Yale J.Biol.Med.* **70**, 391-402.
- Buerkle, M.A., Pahernik, S.A., Sutter, A., Jonczyk, A., Messmer, K. & Dellian, M. (2000) Treatment with a small peptide antagonist against alpha v integrins inhibits angiogenesis, growth and metastasis of tumors in vivo. *J.Vasc.Res.* **37**, 321
- Buerkle, M.A., Pahernik, S.A., Sutter, A., Jonczyk, A., Messmer, K. & Dellian, M. (2002) Inhibition of the alpha v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours *in vivo*. *Br.J.Cancer* **86**, 788-795.
- Burrows, F.J. & Thorpe, P.E. (1994) Vascular targeting--a new approach to the therapy of solid tumors. *Pharmacol.Ther.* **64**, 155-174.
- Carson, D.A. & Ribeiro, J.M. (1993) Apoptosis and disease. *Lancet* **341**, 1251-1254.

- Cheresh, D.A. (1987) Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**, 6471-6475.
- Cheresh, D.A. (1992) Structural and biologic properties of integrin-mediated cell adhesion. *Clin.Lab.Med.* **12**, 217-236.
- Clark, R.A., Lanigan, J.M., DellaPelle, P., Manseau, E., Dvorak, H.F. & Colvin, R.B. (1982) Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J.Invest.Dermatol.* **79**, 264-269.
- Cohen, J. (1999) Behind the headlines of endostatin's ups and downs. *Science* **238**, 1250-1251.
- D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E. & Folkman, J. (1994) Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 4082-4085.
- D'Amore, P.A. & Thompson, R.W. (1987) Mechanisms of angiogenesis. *Ann.Rev.Physiol.* **49**, 453-464.
- Davis, D.L., Dinse, G.E. & Hoel, D.G. (1994) Decreasing cardiovascular disease and increasing cancer among whites in the United States from 1973 through 1987. Good news and bad news. *JAMA* **271**, 431-437.
- Dechantsreiter, M.A., Planker, E., Matha, B., Lohof, E., Hoelzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S.L. & Kessler, H. (1999) N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists. *J.Med.Chem.* **42**, 3033-3040.
- Dellian, M. (1993a) Einfluß einer kombinierten Behandlung mit Stoßwellen und Hyperthermie auf Durchblutung, Energiestoffwechsel und Wachstum von Tumoren. [Medizinische Dissertation] Ludwig-Maximilians-Universität München.

- Dellian, M., Abels, C., Kuhnle, G.E. & Goetz, A.E. (1995) Effects of photodynamic therapy on leucocyte-endothelium interaction: differences between normal and tumour tissue. *Br.J.Cancer* **72**, 1125-1130.
- Dellian, M., Richert, C., Gamarra, F. & Goetz, A.E. (1996a) Photodynamic eradication of amelanotic melanoma of the hamster with fast acting photosensitizers. *Int.J.Cancer* **65**, 246-248.
- Dellian, M., Walenta, S., Gamarra, F., Kuhnle, G.E., Mueller-Klieser, W. & Goetz, A.E. (1993b) Ischemia and loss of ATP in tumours following treatment with focused high energy shock waves. *Br.J.Cancer* **68**, 26-31.
- Dellian, M., Walenta, S., Gamarra, F., Kuhnle, G.E., Mueller Klieser, W. & Goetz, A.E. (1994) High-energy shock waves enhance hyperthermic response of tumors: effects on blood flow, energy metabolism, and tumor growth. *J.Natl.Cancer Inst.* **86**, 287-293.
- Dellian, M., Walenta, S., Kuhnle, G.E., Gamarra, F., Mueller-Klieser, W. & Goetz, A.E. (1993c) Relation between autoradiographically measured blood flow and ATP concentrations obtained from imaging bioluminescence in tumors following hyperthermia. *Int.J.Cancer* **53**, 785-791.
- Dellian, M., Witwer, B.P., Salehi, H.A., Yuan, F. & Jain, R.K. (1996b) Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *Am.J.Pathol.* **149**, 59-71.
- Denekamp, J. (1992) Inadequate vasculature in solid tumours: consequences for cancer research strategies. *BJR.Suppl.* **24**, 111-117.
- Denekamp, J. (1993) Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br.J.Radiol.* **66**, 181-196.

- Dinse, G.E., Umbach, D.M., Sasco, A.J., Hoel, D.G. & Davis, D.L. (1999) Unexplained increases in cancer incidence in the United States from 1975 to 1994: possible sentinel health indicators? *Annu.Rev.Public Health* **20**, 173-209.
- Doll, R. (1992) Are we winning the war against cancer? A review in memory of Keith Durrant. *Clin.Oncol.(R.Coll.Radiol.)* **4**, 257-266.
- Dvorak, H.F., Nagy, J.A., Dvorak, J.T. & Dvorak, A.M. (1988) Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am.J.Pathol.* **133**, 95-109.
- Dvorak, H.F., Nagy, J.A., Feng, D., Brown, L.F. & Dvorak, A.M. (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **237**, 97-132.
- Eberhard, A., Kahlert, S., Goede, V., Hemmerlein, B., Plate, K.H. & Augustin, H.G. (2000) Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* **60**, 1388-1393.
- Eliceiri, B.P. & Cheresch, D.A. (1999) The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J.Clin.Invest.* **103**, 1227-1230.
- Endrich, B., Asaishi, K., Goetz, A.E. & Messmer, K. (1980) Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res.Exp.Med.(Berl.)* **177**, 125-134.
- Endrich, B., Goetz, A. & Messmer, K. (1982b) Distribution of microflow and oxygen tension in hamster melanoma. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* **1**, 81-99.

- Endrich, B., Hammersen, F., Goetz, A.E. & Messmer, K. (1982a) Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3. *J.Natl.Cancer Inst.* **68**, 475-485.
- Endrich, B., Hammersen, F. & Messmer, K. (1988b) Capillary ultrastructure and microcirculatory function of malignant tumors. *Adv.Exp.Med.Biol.* **242**, 205-214.
- Endrich, B., Hammersen, F. & Messmer, K. (1988a) Hyperthermia-induced changes in tumor microcirculation. *Recent.Results.Cancer Res.* **107**, 44-59.
- Endrich, B. & Messmer, K. (1981) Microcirculation of transplanted tumors. *Arzneimittelforschung.* **31**, 2007-2011.
- Engerman, R.L., Pfaffenbach, D. & Davis, M.D. (1967) Cell turnover of capillaries. *Lab.Invest.* **17**, 738-743.
- Erdreich-Epstein, A., Shimada, H., Groshen, S., Liu, M., Metelitsa, L.S., Kim, K.S., Stins, M.F., Seeger, R.C. & Durden, D.L. (2000) Integrins alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 are expressed by endothelium of high-risk neuroblastoma and their inhibition is associated with increased endogenous ceramide. *Cancer Res.* **60**, 712-721.
- Ferrara, N. (1995) Leukocyte adhesion. Missing link in angiogenesis. *Nature* **376**, 467
- Ferrara, N. (1996) Natural killer cells, adhesion and tumor angiogenesis. *Nat.Med.* **2**, 971-972.
- Ferrara, N., Chen, H., Davis-Smyth, T., Gerber, H.P., Nguyen, T.N., Peers, D., Chisholm, V., Hillan, K.J. & Schwall, R.H. (1998) Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat.Med.* **4**, 336-340.

- Fichtel, B., Fülgraff, G., Neumann, H.G., Wollenberg, P., Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. & Starke, K. (1996) Arzneimittellekonzentration im Organismus in Abhängigkeit von der Zeit (Pharmakokinetik). In: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. & Starke, K., (Hrsg.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 7. Auflage Seiten 57-82. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag
- Fidler, I.J. & Balch, C.M. (1987) The biology of cancer metastasis and implications for therapy. *Curr.Probl.Surg.* **24**, 129-209.
- Fidler, I.J. & Ellis, L.M. (1994) The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* **79**, 185-188.
- Fidler, I.J., Gersten, D.M. & Hart, I.R. (1978) The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv.Cancer Res.* **28**, 149-250.
- Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N.Engl.J.Med.* **285**, 1182-1186.
- Folkman, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J.Natl.Cancer Inst.* **82**, 4-6.
- Folkman, J. (1995a) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med.* **1**, 27-31.
- Folkman, J. (1995b) Tumor angiogenesis. In: Mendelson, J., Howley, P.M., Israel, M.A. & Liotta, L.A., (Eds.) *The molecular basis of cancer*, Seiten 206-232. Philadelphia: W.B. Saunders
- Folkman, J. (1996) New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur.J.Cancer* **32a**, 2534-9.
- Folkman, J. (1997) Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *Exs.* **79**, 1-8.

- Folkman, J., Long, D. & Becker, F. (1963) Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* **16**, 453-459.
- Folkman, J. & Shing, Y. (1992) Angiogenesis. *J.Biol.Chem.* **267**, 10931-10934.
- Folkman, J., Watson, K., Ingber, D. & Hanahan, D. (1989) Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* **339**, 58-61.
- Fong, T.A., Shawver, L.K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T.J., Kim, Y.H., Schreck, R., Wang, X., Risau, W., Ullrich, A., Hirth, K.P. & McMahon, G. (1999) SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.* **59**, 99-106.
- Fortner, J.G., Mahy, A.G. & Schrodt, G.R. (1961) Transplantable tumors of the Syrian (golden) hamster. Part I: Tumors of the alimentary tract, endocrine glands and melanomas. *Cancer Res.* **21**, 161-198.
- Fox, S.B., Turner, G.D., Gatter, K.C. & Harris, A.L. (1995) The increased expression of adhesion molecules ICAM-3, E- and P-selectins on breast cancer endothelium. *J.Pathol.* **177**, 369-376.
- Franke, N. & Endrich, B. (1983) Effects of halothane and enflurane on the microcirculation. *Anästh.Intensivther.Notfallmed.* **18**, 285-290.
- Franke, N., Endrich, B., Laubenthal, H., Peter, K. & Messmer, K. (1982) The effect of pentobarbital on the microcirculation of skeletal muscles and the subcutis. An animal-experimental study. *Anästh.Intensivther.Notfallmed.* **17**, 11-14.
- Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A. & Cheresch, D.A. (1995) Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* **270**, 1500-2.

- Fritsch, C. (1996) Natrium-Fluoreszein-Fluxmetrie im amelanotischen Melanom des Hamsters A-Mel-3 vor und nach photodynamischer Therapie. [Medizinische Dissertation] Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Fukumura, D., Salehi, H.A., Witwer, B., Tuma, R.F., Melder, R.J. & Jain, R.K. (1995) Tumor necrosis factor alpha-induced leukocyte adhesion in normal and tumor vessels: effect of tumor type, transplantation site, and host strain. *Cancer Res.* **55**, 4824-4829.
- Funk, W., Endrich, B., Messmer, K. & Intaglietta, M. (1983) Spontaneous arteriolar vasomotion as a determinant of peripheral vascular resistance. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* **2**, 11-25.
- Gamarra, F., Spelsberg, F., Dellian, M. & Goetz, A.E. (1993) Complete local tumor remission after therapy with extra-corporeally applied high-energy shock waves (HESW). *Int.J.Cancer* **55**, 153-6.
- Gamarra, F., Spelsberg, F., Kuhnle, G.E. & Goetz, A.E. (1993) High-energy shock waves induce blood flow reduction in tumors. *Cancer Res.* **53**, 1590-1595.
- Gasparini, G., Bonoldi, E., Viale, G., Verderio, P., Boracchi, P., Panizzoni, G.A., Radaelli, U., Di Bacco, A., Guglielmi, R.B. & Bevilacqua, P. (1996) Prognostic and predictive value of tumour angiogenesis in ovarian carcinomas. *Int.J.Cancer* **69**, 205-211.
- Gasparini, G., Weidner, N., Bevilacqua, P., Maluta, S., Dalla, P.P., Caffo, O., Barbareschi, M., Boracchi, P., Marubini, E. & Pozza, F. (1994) Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J.Clin.Oncol.* **12**, 454-466.
- Gerlowski, L.E. & Jain, R.K. (1986) Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc.Res.* **31**, 288-305.

- Goetz, A., Deininger, F.D., Conzen, P. & Brendel, W. (1987) Effects of FPL 55712 on leukotriene C4/leukotriene D4-induced vasoconstriction and macromolecular permeability. *Adv.Prostaglandin.Thromboxane.Leukot.Res.* **17B**, 651-656.
- Goetz, A.E. (1987) Quantitative Mikrozirkulationsanalyse im amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3. [Medizinische Disstertation] Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Gorski, D.H., Mauceri, H.J., Salloum, R.M., Gately, S., Hellman, S., Beckett, M.A., Sukhatme, V.P., Soff, G.A., Kufe, D.W. & Weichselbaum, R.R. (1998) Potentiation of the antitumor effect of ionizing radiation by brief concomitant exposures to angiostatin. *Cancer Res.* **58**, 5686-9.
- Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W. & Giaccia, A.J. (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* **379**, 88-91.
- Griffioen, A.W., Tromp, S.C. & Hillen, H.F. (1998) Angiogenesis modulates the tumour immune response. *Int.J.Exp.Pathol.* **79**, 363-368.
- Guba, M., Cernaianu, G., Koehl, G., Geissler, E.K., Jauch, K.W., Anthuber, M., Falk, W. & Steinbauer, M. (2001) A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* **61**, 5575-5579.
- Gurrath, M., Muller, G., Kessler, H., Aumailley, M. & Timpl, R. (1992) Conformation/activity studies of rationally designed potent anti- adhesive RGD peptides. *Eur.J.Biochem.* **210**, 911-921.
- Hammersen, F., Endrich, B. & Messmer, K. (1985) The fine structure of tumor blood vessels. I. Participation of non-endothelial cells in tumor angiogenesis. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* **4**, 31-43.

- Hammes, H.P., Brownlee, M., Jonczyk, A., Sutter, A. & Preissner, K.T. (1996) Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nat.Med.* **2**, 529-533.
- Hanahan, D. & Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364.
- Hanna, N.N., Seetharam, S., Mauceri, H.J., Beckett, M.A., Jaskowiak, N.T., Salloum, R.M., Hari, D., Dhanabal, M., Ramchandran, R., Kalluri, R., Sukhatme, V.P., Kufe, D.W. & Weichselbaum, R.R. (2000) Antitumor interaction of short-course endostatin and ionizing radiation. *Cancer J.* **6**, 287-293.
- Harris, A.L. (1997) Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet* **349 Suppl 2**, 13-5.
- Harris, A.L. (1998) Are angiostatin and endostatin cures for cancer? *Lancet* **351**, 1598-1599.
- Haubner, R., Wester, H.J., Reuning, U., Senekowitsch-Schmidtke, R., Diefenbach, B., Kessler, H., Stocklin, G. & Schwaiger, M. (1999) Radiolabeled alpha(v)beta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J.Nucl.Med.* **40**, 1061-1071.
- Haubner, R., Wester, H.J., Weber, W.A., Mang, C., Ziegler, S.I., Goodman, S.L., Senekowitsch-Schmidtke, R., Kessler, H. & Schwaiger, M. (2001) Noninvasive imaging of alpha(v)beta3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res.* **61**, 1781-1785.
- Haviv, F., Fitzpatrick, T.D., Swenson, R.E., Nichols, C.J., Mort, N.A., Bush, E.N., Diaz, G., Bammert, G., Nguyen, A. & Rhutasel, N.S. (1993) Effect of N-methyl substitution of the peptide bonds in luteinizing hormone-releasing hormone agonists. *J.Med.Chem.* **36**, 363-369.
- Hobson, B. & Denekamp, J. (1984) Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br.J.Cancer* **49**, 405-413.

- Holmgren, L., O'Reilly, M.S. & Folkman, J. (1995) Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat.Med.* **1**, 149-53.
- Horton, M.A. (1999) Arg-gly-Asp (RGD) peptides and peptidomimetics as therapeutics: relevance for renal diseases. *Exp.Nephrol.* **7**, 178-184.
- Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.
- Ide, A.G., Baker, N.H. & Warren, S.L. (1939) Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am.J.Roentgenol.* **42**, 891-899.
- Imura, Y., Stassen, J.M., Vreys, I., Lesaffre, E., Gold, H.K. & Collen, D. (1992) Synergistic antithrombotic properties of G4120, a RGD-containing synthetic peptide, and argatroban, a synthetic thrombin inhibitor, in a hamster femoral vein platelet-rich thrombosis model. *Thromb.Haemost.* **68**, 336-40.
- Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H. & Folkman, J. (1990) Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* **348**, 555-7.
- Jaffe, E.A. (1987) Cell biology of endothelial cells. *Hum.Pathol.* **18**, 234-239.
- Jain, R.K. (1988) Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res.* **48**, 2641-2658.
- Jain, R.K., Koenig, G.C., Dellian, M., Fukumura, D., Munn, L.L. & Melder, R.J. (1996) Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Cancer Metastasis Rev.* **15**, 195-204.
- Jain, R.K., Schlenger, K., HoECKel, M. & Yuan, F. (1997) Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat.Med.* **3**, 1203-1208.

- Takeji, Y. & Teicher, B.A. (1997) Preclinical studies of the combination of angiogenic inhibitors with cytotoxic agents. *Invest.New Drugs* **15**, 39-48.
- Kaplan, E.L. & Meier, P. (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J.Am.Stat.Assoc.* **53**, 457-481.
- Kerbel, R.S. (1997) A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* **390**, 335-336.
- Keshet, E. & Ben-Sasson, S.A. (1999) Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. *J.Clin.Invest.* **104**, 1497-1501.
- Kessler, H., Gratias, R., Diefenbach, B., Finsinger, D., Geyer, A., Gurrath, M., Goodman, S., Hoelzemann, G., Haubner, R., Jonczyk, A., Muller, G., von Roedern, E. & Wermuth, J. (1995) Design of superactive and selective integrin receptor antagonists containing the RGD sequence. *Lett.Pept.Sci.* **2**, 155-160.
- Klyszcz, T., Juenger, M., Jung, F. & Zeintl, H. (1997) Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed.Tech.Berl.* **42**, 168-175.
- Kumar, C.C., Armstrong, L., Yin, Z., Malkowski, M., Maxwell, E., Ling, H., Yaremko, B., Liu, M., Varner, J., Smith, E.M., Neustadt, B. & Nechuta, T. (2000) Targeting integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 for blocking tumor-induced angiogenesis. *Adv.Exp.Med.Biol.* **476**, 169-180.
- Kumar, C.C., Malkowski, M., Yin, Z., Tanghetti, E., Yaremko, B., Nechuta, T., Varner, J., Liu, M., Smith, E.M., Neustadt, B., Presta, M. & Armstrong, L. (2001) Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin receptor antagonist. *Cancer Res.* **61**, 2232-2238.
- Leavesley, D.I., Schwartz, M.A., Rosenfeld, M. & Cheresch, D.A. (1993) Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J.Cell Biol.* **121**, 163-170.

- Lee, C.G., Heijn, M., di Tomaso, E., Griffon-Etienne, G., Ancukiewicz, M., Koike, C., Park, K.R., Ferrara, N., Jain, R.K., Suit, H.D. & Boucher, Y. (2000) Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res.* **60**, 5565-5570.
- Less, J.R., Posner, M.C., Boucher, Y., Borochoviz, D., Wolmark, N. & Jain, R.K. (1992) Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors. *Cancer Res.* **52**, 6371-6374.
- Leunig, M., Goetz, A.E., Dellian, M., Zetterer, G., Gamarra, F., Jain, R.K. & Messmer, K. (1992a) Interstitial fluid pressure in solid tumors following hyperthermia: possible correlation with therapeutic response. *Cancer Res.* **52**, 487-490.
- Leunig, M., Goetz, A.E., Gamarra, F., Zetterer, G., Messmer, K. & Jain, R.K. (1994a) Photodynamic therapy-induced alterations in interstitial fluid pressure, volume and water content of an amelanotic melanoma in the hamster. *Br.J.Cancer* **69**, 101-103.
- Leunig, M., Leunig, A., Lankes, P. & Goetz, A.E. (1994b) Evaluation of photodynamic therapy-induced heating of hamster melanoma and its effect on local tumour eradication. *Int.J.Hyperthermia.* **10**, 297-306.
- Leunig, M., Yuan, F., Menger, M.D., Boucher, Y., Goetz, A.E., Messmer, K. & Jain, R.K. (1992b) Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res.* **52**, 6553-6560.
- Lingen, M.W. (2001) Role of Leukocytes and Endothelial Cells in the Development of Angiogenesis in Inflammation and Wound Healing. *Arch.Pathol.Lab.Med.* **125**, 67-71.
- Liotta, L.A., Saidel, M.G. & Kleinerman, J. (1976) The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res.* **36**, 889-894.

- Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C.M. & Shafie, S. (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284**, 67-68.
- Lipowsky, H.H. & Zweifach, B.W. (1978) Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc.Res.* **15**, 93-101.
- Lode, H.N., Moehler, T., Xiang, R., Jonczyk, A., Gillies, S.D., Cheresch, D.A. & Reisfeld, R.A. (1999) Synergy between an antiangiogenic integrin alpha v antagonist and an antibody-cytokine fusion protein eradicates spontaneous tumor metastases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 1591-1596.
- Luna, J., Tobe, T., Mousa, S.A., Reilly, T.M. & Campochiaro, P.A. (1996) Antagonists of integrin alpha v beta 3 inhibit retinal neovascularization in a murine model. *Lab.Invest.* **75**, 563-573.
- Luscinskas, F.W. & Lawler, J. (1994) Integrins as dynamic regulators of vascular function. *Faseb J.* **8**, 929-938.
- Macchiarini, P., Fontanini, G., Hardin, M.J., Squartini, F. & Angeletti, C.A. (1992) Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* **340**, 145-146.
- Manavalan, P. & Momany, F.A. (1980) Conformational energy studies on N-methylated analogs of thyrotropin releasing hormone, enkephalin, and luteinizing hormone-releasing hormone. *Biopolymers* **19**, 1943-1973.
- Mauceri, H.J., Hanna, N.N., Beckett, M.A., Gorski, D.H., Staba, M.J., Stellato, K.A., Bigelow, K., Heimann, R., Gately, S., Dhanabal, M., Soff, G.A., Sukhatme, V.P., Kufe, D.W. & Weichselbaum, R.R. (1998) Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy. *Nature* **394**, 287-291.

- Mazur, R.H., James, P.A., Tyner, D.A., Hallinan, E.A., Sanner, J.H. & Schulze, R. (1980) Bradykinin analogues containing N alpha-methyl amino acids. *J.Med.Chem.* **23**, 758-763.
- Melder, R.J., Koenig, G.C., Witwer, B.P., Safabakhsh, N., Munn, L.L. & Jain, R.K. (1996) During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat.Med.* **2**, 992-997.
- Menke, H. & Vaupel, P. (1988) Effect of injectable or inhalational anesthetics and of neuroleptic, neuroleptanalgesic, and sedative agents on tumor blood flow. *Radiat.Res.* **114**, 64-76.
- Miller, F.N., Sims, D.E., Schuschke, D.A. & Abney, D.L. (1992) Differentiation of light-dye effects in the microcirculation. *Microvasc.Res.* **44**, 166-184.
- Mitjans, F., Meyer, T., Fittschen, C., Goodman, S., Jonczyk, A., Marshall, J.F., Reyes, G. & Piulats, J. (2000) In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins. *Int.J.Cancer* **87**, 716-723.
- Montesano, R., Vassalli, J.D., Baird, A., Guillemin, R. & Orci, L. (1986) Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **83**, 7297-7301.
- Montgomery, A.M., Reisfeld, R.A. & Cheresch, D.A. (1994) Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 8856-60.
- Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L. & Sukhatme, V.P. (1995) Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res.* **55**, 6161-6165.
- Netland, P.A. & Zetter, B.R. (1984) Organ-specific adhesion of metastatic tumor cells in vitro. *Science* **224**, 1113-1115.

- Netti, P.A., Baxter, L.T., Boucher, Y., Skalak, R. & Jain, R.K. (1995) Time-dependent behavior of interstitial fluid pressure in solid tumors: implications for drug delivery. *Cancer Res.* **55**, 5451-5458.
- Netti, P.A., Roberge, S., Boucher, Y., Baxter, L.T. & Jain, R.K. (1996) Effect of transvascular fluid exchange on pressure-flow relationship in tumors: a proposed mechanism for tumor blood flow heterogeneity. *Microvasc.Res.* **52**, 27-46.
- Nicolson, G.L. (1988) Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev.* **7**, 143-188.
- Nicosia, R.F. & Bonanno, E. (1991) Inhibition of angiogenesis in vitro by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptide. *Am.J.Pathol.* **138**, 829-833.
- Nolte, D., Botzlar, A., Pickelmann, S., Bouskela, E. & Messmer, K. (1997) Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J.Lab.Clin.Med.* **130**, 314-327.
- Nolte, D., Lehr, H.A. & Messmer, K. (1991) Adenosine inhibits postischemic leukocyte-endothelium interaction in postcapillary venules of the hamster. *Am.J.Physiol.* **261**, H651-H655
- Nolte, D., Pickelmann, S., Lang, M., Keipert, P. & Messmer, K. Compatibility of different colloid plasma expanders with perflubron emulsion: an intravital microscopic study in the hamster. *Anesthesiology* 2000.Nov.;93.(5.):1261.-70. **93**, 1261-1270.
- Nolte, D., Zeintl, H., Steinbauer, M., Pickelmann, S. & Messmer, K. (1995) Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* **15**, 244-249.

- O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. & Folkman, J. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**, 277-285.
- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C. & Folkman, J. (1996) Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat.Med.* **2**, 689-692.
- Oda, T., Lehmann, A. & Endrich, B. (1984) Capillary blood flow in the amelanotic melanoma of the hamster after isovolemic hemodilution. *Biorheology.* **21**, 509-520.
- Okunieff, P., Rummeny, E., Vaupel, P., Skates, S., Willett, C., Neuringer, L.J. & Suit, H.D. (1988) Effects of pentobarbital anesthesia on the energy metabolism of murine tumors studied by in vivo ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Radiat.Res.* **115**, 361-372.
- Papenfuss, H.D., Gross, J.F., Intaglietta, M. & Treese, F.A. (1979) A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc.Res.* **18**, 311-318.
- Petitclerc, E., Stromblad, S., von Schalscha, T.L., Mitjans, F., Piulats, J., Montgomery, A.M., Cheresch, D.A. & Brooks, P.C. (1999) Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res.* **59**, 2724-2730.
- Pluda, J.M. (1997) Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. *Semin.Oncol.* **24**, 203-218.
- Ray, J.M. & Stetler Stevenson, W.G. (1994) The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur.Respir.J.* **7**, 2062-2072.
- Reinhold, H.S. & Endrich, B. (1986) Tumour microcirculation as a target for hyperthermia. *Int.J.Hyperthermia.* **2**, 111-137.

- Renard, N., Lienard, D., Lespagnard, L., Eggermont, A., Heimann, R. & Lejeune, F. (1994) Early endothelium activation and polymorphonuclear cell invasion precede specific necrosis of human melanoma and sarcoma treated by intravascular high-dose tumour necrosis factor alpha (rTNF alpha). *Int.J.Cancer* **57**, 656-663.
- Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-4.
- Roh, H.D., Boucher, Y., Kalnicki, S., Buchsbaum, R., Bloomer, W.D. & Jain, R.K. (1991) Interstitial hypertension in carcinoma of uterine cervix in patients: possible correlation with tumor oxygenation and radiation response. *Cancer Res.* **51**, 6695-6698.
- Ron, D., Gilon, C., Hanani, M., Vromen, A., Selinger, Z. & Chorev, M. (1992) N-methylated analogs of Ac[Nle28,31]CCK(26-33): synthesis, activity, and receptor selectivity. *J.Med.Chem.* **35**, 2806-2811.
- Ruoslahti, E. & Engvall, E. (1997) Integrins and vascular extracellular matrix assembly. *J.Clin.Invest.* **99**, 1149-1152.
- Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M.D. (1986) Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell* **44**, 517-518.
- Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M.D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**, 491-7.
- Ruoslahti, E. & Reed, J.C. (1994) Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* **77**, 477-478.
- Sabatine, M.S. & Jang, I.K. (2000) The use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients with coronary artery disease. *Am.J.Med.* **109**, 224-237.
- Sachs, L. (1984) *Angewandte Statistik*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.

- Saetzler, R.K., Jallo, J., Lehr, H.A., Philips, C.M., Vasthare, U., Arfors, K.E. & Tuma, R.F. (1997) Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J.Histochem.Cytochem.* **45**, 505-513.
- Salven, P., Orpana, A. & Joensuu, H. (1999) Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin.Cancer Res.* **5**, 487-491.
- Sandison, J.C. (1924) A new method for the microscopic study of living growing tissue by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat.Rec.* **28**, 281-287.
- Sankar, S., Mahooti-Brooks, N., Bensen, L., McCarthy, T.L., Centrella, M. & Madri, J.A. (1996) Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J.Clin.Invest.* **97**, 1436-1446.
- Schmid-Schoenbein, G.W., Zweifach, B.W. & Kovalcheck, S. (1977) The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues. *Microvasc.Res.* **14**, 303-317.
- Sckell, A., Safabakhsh, N., Dellian, M. & Jain, R.K. (1998) Primary tumor size-dependent inhibition of angiogenesis at a secondary site: an intravital microscopic study in mice. *Cancer Res.* **58**, 5866-5869.
- Senger, D.R., Claffey, K.P., Benes, J.E., Perruzzi, C.A., Sergiou, A.P. & Detmar, M. (1997) Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 13612-13617.

- Senger, D.R., Ledbetter, S.R., Claffey, K.P., Papadopoulos Sergiou, A., Peruzzi, C.A. & Detmar, M. (1996) Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am.J.Pathol.* **149**, 293-305.
- Sinitsina, I. (2000) Der Einfluß von Fluoreszenzfarbstoffen auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion *in vivo*. [Medizinische Dissertation] Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Slapak, C.A. & Kufe, D.W. (1995) Grundlagen der Krebstherapie. In: Isselbacher, K.J., Braunwald, E., Wilson, J.D., Martin, J.B., Fauci, A.S. & Kasper, D.L., (Hrsg.) *Harrisons Innere Medizin*, 13. Auflage Seiten 2137-2153. Berlin, Wien, New York: Blackwell Wissenschaft/McGraw-Hill
- Springer, T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314.
- Steinbauer, M., Harris, A.G., Abels, C. & Messmer, K. (2000) Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks.Arch.Surg.* **385**, 290-298.
- Stohrer, M., Boucher, Y., Stangassinger, M., & Jain, R.K. (2000) Oncotic pressure in solid tumors is elevated. *Cancer Res.* **60**, 4251-4254.
- Storgard, C.M., Stupack, D.G., Jonczyk, A., Goodman, S.L., Fox, R.I. & Cheresh, D.A. (1999) Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an alphavbeta3 antagonist. *J.Clin.Invest.* **103**, 47-54.
- Stromblad, S., Becker, J.C., Yebra, M., Brooks, P.C. & Cheresh, D.A. (1996) Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *J.Clin.Invest.* **98**, 426-433.

- Sugarbaker, E.V. & Ketcham, A.S. (1977) Mechanisms and prevention of cancer dissemination: an overview. *Semin.Oncol.* **4**, 19-32.
- Sullivan, G.W., Sarembock, I.J. & Linden, J. (2000) The role of inflammation in vascular diseases. *J.Leukoc.Biol.* **67**, 591-602.
- Sutherland, R.M. (1988) Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* **240**, 177-84.
- Teicher, B.A. (1994) Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 139-168.
- Teicher, B.A. (1995) Physiologic mechanisms of therapeutic resistance. Blood flow and hypoxia. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* **9**, 475-506.
- Teicher, B.A., Williams, J.I., Takeuchi, H., Ara, G., Herbst, R.S. & Buxton, D. (1998) Potential of the aminosterol, squalamine in combination therapy in the rat 13,762 mammary carcinoma and the murine Lewis lung carcinoma. *Anticancer Res.* **18**, 2567-2573.
- Tomayko, M.M. & Reynolds, C.P. (1989) Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother.Pharmacol.* **24**, 148-154.
- Tschopp, J.F., Mazur, C., Gould, K., Connolly, R. & Pierschbacher, M.D. (1994) Inhibition of thrombosis by a selective fibrinogen receptor antagonist without effect on bleeding time. *Thromb.Haemost.* **72**, 119-24.
- Vajkoczy, P., Ullrich, A. & Menger, M.D. (2000) Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia.* **2**, 53-61.
- Vermeulen, P.B., Gasparini, G., Fox, S.B., Toi, M., Martin, L., McCulloch, P., Pezzella, F., Viale, G., Weidner, N., Harris, A.L. & Dirix, L.Y. (1996) Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur.J.Cancer* **32A**, 2474-2484.

- Vermeulen, P.B., Verhoeven, D., Fierens, H., Hubens, G., Goovaerts, G., Van Marck, E., De Bruijn, E.A., Van Oosterom, A.T. & Dirix, L.Y. (1995) Microvessel quantification in primary colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Br.J.Cancer* **71**, 340-343.
- Wayner, E.A., Orlando, R.A. & Cheres, D.A. (1991) Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J.Cell Biol.* **113**, 919-929.
- Weichselbaum, R.R., Beckett, M.A., Vokes, E.E., Brachman, D.G., Haraf, D., Hallahan, D. & Kufe, D. (1995) Cellular and molecular mechanisms of radioresistance. *Cancer Treat.Res.* **74**, 131-140.
- Weidner, N. (1995) Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am.J.Pathol.* **147**, 9-19.
- Weidner, N., Carroll, P.R., Flax, J., Blumenfeld, W. & Folkman, J. (1993) Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am.J.Pathol.* **143**, 401-409.
- Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R. & Folkman, J. (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N.Engl.J.Med.* **324**, 1-8.
- Weinstat-Saslow, D. & Steeg, P.S. (1994) Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances. *Faseb J.* **8**, 401-407.
- Weiss, N., Delius, M., Gambihler, S., Dirschedl, P., Goetz, A. & Brendel, W. (1990) Influence of the shock wave application mode on the growth of A-Mel 3 and SSK2 tumors in vivo. *Ultrasound Med.Biol.* **16**, 595-605.
- Weißbach, L. (27. Juni, 2000) Tanker auf großer Fahrt. *Süddeutsche Zeitung* Nr. 145 Seite 11
- Wormser, U., Laufer, R., Hart, Y., Chorev, M., Gilon, C. & Selinger, Z. (1986) Highly selective agonists for substance P receptor subtypes. *EMBO J.* **5**, 2805-2808.

- Wu, N.Z., Klitzman, B., Dodge, R. & Dewhirst, M.W. (1992) Diminished leukocyte-endothelium interaction in tumor microvessels. *Cancer Res.* **52**, 4265-4268.
- Yasuda, M., Shimizu, S., Tokuyama, S., Watanabe, T., Kiuchi, Y. & Yamamoto, T. (2000) A novel effect of polymorphonuclear leukocytes in the facilitation of angiogenesis. *Life Sci.* **66**, 2113-2121.
- Yoneda, J., Killion, J.J., Bucana, C.D. & Fidler, I.J. (1999) Angiogenesis and growth of murine colon carcinoma are dependent on infiltrating leukocytes. *Cancer Biother.Radiopharm.* **14**, 221-230.
- Young, J.S., Lumsden, C.E. & Stalker, A.L. (1950) The significance of the "tissue pressure" of normal testicular and of neoplastic (Brown-Pearce carcinoma) tissue in the rabbit. *J.Pathol.Bacteriol.* **62**, 313-333.
- Zanelli, G.D., Lucas, P.B. & Fowler, J.F. (1975) The effect of anaesthetics on blood perfusion in transplanted mouse tumours. *Br.J.Cancer* **32**, 380-390.
- Zetter, B.R. (1990) The cellular basis of site-specific tumor metastasis. *N.Engl.J.Med.* **322**, 605-612.
- Zweifach, B.W. (1973) Microcirculation. *Annu.Rev.Physiol.* **35**, 117-150.

G. VERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE DER ARBEIT

Originalarbeiten

M. A. Buerkle, S. A. Pahernik, A. Sutter, A. Jonczyk, K. Messmer and M. Dellian
Inhibition of the alpha v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis,
growth and metastasis of solid tumours *in vivo*. *Br.J.Cancer* 2002 **86**, 788-795.

Buchbeiträge

M. A. Bürkle, S. A. Pahernik, A. Sutter, A. Jonczyk, K. Meßmer, und M. Dellian,
Antiangiogenetische Therapie von Tumoren durch Inhibition des Integrins $\alpha_v\beta_3$ mit
einem zyklischen Peptid. *Langenbecks Arch. Surg.:Suppl. I* (Forumband) 349-353, 1999

Abstracts

M. A. Buerkle, S. A. Pahernik, A. Sutter, A. Jonczyk, K. Messmer and M. Dellian
Antiangiogenic cancer therapy by inhibition of the integrin $\alpha_v\beta_3$ using a cyclic peptide
116. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie; München, April 1999

M. A. Buerkle, S. A. Pahernik, A. Sutter, A. Jonczyk, K. Messmer, M. Dellian,
Treatment with a small peptide antagonist against α_v -Integrins inhibits angiogenesis,
growth and metastasis of tumors *in vivo*. *J. Vasc. Res* 2000; 37:321

Schmitt-Sody M, Krasnici S, Manegold PC, **Buerkle MA**, Sauer B, Schulze B, Teifel
M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M.

Improved antitumoral effect of cationic liposome encapsulated paclitaxel to an
amelanotic melanoma in hamster.

J Vasc Res 2001; 38:515

Poster

Effekt eines kleinmolekularen Antagonisten gegen α_v -Integrine auf Angiogenese, Wachstum und Metastasierung von Tumoren *in vivo*.

Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und vaskuläre Biologie e.V.,
München

H. ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN

Die vorliegende experimentelle Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer) unter Betreuung von Herrn Dr. Marc Dellian durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt nach Beendigung dieser experimentellen Arbeit:

Herrn **Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer** für die Aufnahme in sein Institut und die Überlassung des Themas. Unter seiner Leitung lernte ich nicht nur die Basis des wissenschaftlichen Arbeitens, sondern auch die Faszination die davon ausgeht kennen. In ihm fand ich einen ausgezeichneten Lehrer, der mir stets offen für Fragen und Probleme gegenüberstand. Seine Ratschläge, seine stets konstruktive Kritik und sein schier unerschöpfliches Wissen stellten eine enorme Bereicherung, nicht nur für diese experimentelle Arbeit, sondern auch für meinen weiteren beruflichen wie persönlichen Werdegang dar.

Besonderen Dank möchte ich dafür aussprechen, daß er stets um das Wohl jedes einzelnen seiner Doktoranden bestrebt war und sich für sie mit ganzer Tatkraft einsetzte und engagierte wo er konnte. Sein Einsatz in Lehre und Forschung werden mir stets ein Vorbild sein.

Herrn **Dr. M. Dellian**, meinem Betreuer, der mich in sein Team aufnahm und der mich in unermüdlicher Weise durch alle Höhen und Tiefen des experimentellen Arbeitens sicher und mit außerordentlicher fachlicher und menschlicher Kompetenz geleitet hat. Seine Betreuung und Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente war geprägt von Kreativität, Begeisterung und einem ausgezeichneten pädagogischen Geschick, auch komplizierte Sachverhalte verständlich zu vermitteln. Besonders hervorzuheben war seine ausgesprochene Zuverlässigkeit und die fortwährende Bereitschaft, selbst zu den unmöglichsten Zeiten für mich da zu sein und

mir das Gefühl zu geben, in ihm stets und ohne Ausnahmen einen Ansprechpartner zu finden.

Herrn **Dr. Sascha Pahernik**, ehemals wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Chirurgische Forschung, der mir durch seine unermüdliche Hilfsbereitschaft stets kompetent und bereitwillig zur Seite stand und damit zu einem wertvollen persönlichen wie fachlichen Ansprechpartner in allen Bereichen nicht nur der des wissenschaftlichen Arbeitens wurde.

Meinen Mitdoktoranden **Martin Eichhorn** und **Philip Manegold** sowie den wissenschaftlichen Assistenten in unserem Team Herrn **Dr. Senat Krasnici**, Herrn **Dr. Markus Schmitt-Sody** und Herrn **Dr. Sebastian Strieth** für ihre kontinuierliche fachliche und freundschaftliche Unterstützung.

Herrn **Dr. A. Sutter** und Herrn **Dr. A. Jonczyk** (E. Merck, Darmstadt) sowie **Frau Dr. J. Haunschild** (E. Merck, Grafing) für die Unterstützung und Beratung bei der Anwendung der RGD-Peptide sowie die Messung der Plasmakinetiken. Der **Firma E. Merck**, Darmstadt, danke ich weiterhin für die finanzielle Förderung der Arbeiten.

Herrn **Dr. Jürgen Peters** für Beratung in statistischen Fragen und der stets rettenden Hilfe bei jedweden Computerproblemen.

Der medizinisch-technischen Assistentin Frau **Christine Czsapo** für ihre Hilfe bei den Tumorzellkulturen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Aufnahme im Institut und für das immer angenehme und anregende Arbeitsklima.

I. LEBENS LAUF

Martin Alexander Bürkle
geboren am 23. Januar 1973 in Ulm
römisch-katholisch, ledig
Eltern: Dr. med. Peter A. und Heide C. Bürkle

SCHULE

1979-1992 Freie Waldorfschule Ulm
Mai 1992 Abitur

WEHRDIENST

1992-1993 Pioniertruppe, Bayern Kaserne München

STUDIUM

November 1993 Studium der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
April 1996 Ärztliche Vorprüfung
April 1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

FAMULATUREN

September 1996 Allgemein Chirurgie, Krankenhaus Neu-Ulm
April 1997 Innere Medizin / Rheumatologie, Praxis Dr. Bürkle, Ulm
September 1997 Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Klinikum Großhadern
März 1998 Innere Medizin, Klinikum Großhadern, München
September 1998 Family Practice, Straub Clinic, Honolulu, HI, USA

PRAKTISCHES JAHR

Chirurgie Chirurgische Klinik und Poliklinik der LMU München
Innere Medizin Tulane University, School of Medicine, New Orleans, LA, USA
Anaesthesiologie Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum Großhadern, München

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

Seit März 2001 Arzt im Praktikum an der Klinik für Anaesthesiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter)
Seit September 2002 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl)

SPRACHEN

Englisch und Französisch in Wort und Schrift

PRIVATE INTERESSEN

Wassersport, Gitarre, Theater, klassische Literatur