

**Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
(im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, WBex)**

der Ludwig-Maximilians-Universität München

ehem. Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

und der

Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Canis

Ehem. Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

**Die therapeutische Nutzbarkeit von statischen Magnetfeldern bei
EGFR-überexprimierenden Plattenepithelkarzinomen *in vivo***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Ursula Schmidtmayer

aus

Nördlingen

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Hjalmar Hagedorn
PD Dr. med. Sebastian Kobold
PD Dr. med. Dr. med. dent. Sven Otto

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Sebastian Strieth
Dr. med. Donata Gellrich

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2018

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	6
1.1. Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region.....	6
1.2. Tumor Targeting („targeted therapy“) mit Cetuximab.....	7
1.3. Magnetische Felder	8
1.4. Magnetfelder und EGF-Rezeptoren.....	10
2. FRAGESTELLUNG	12
3. MATERIAL UND METHODEN	14
3.1. Versuchstiere	14
3.2. Versuchstierhaltung.....	14
3.3. Das Rückenhautkammermodell	15
3.4. Tumormodell	18
3.4.1. Lewis Lung Karzinom (LLC-1)	18
3.4.2. Zellkultur.....	18
3.4.3. Vorbereitung der Tumorzellen zur Inokulation	19
3.4.4. Inokulation der Tumorzellen.....	19
3.5. Magnet.....	20
3.5.1. Magnetaufbau.....	20
3.5.2. Magnetdosimetrie.....	20
3.5.3. Magnetisierbarkeit im Setup	21
3.5.4. Versuchsaufbau	21
3.6. Cetuximab	22
3.6.1. Therapieplan.....	22
3.7. Makroskopische Dokumentation.....	22
3.7.1. Makroskopischer Messplatz	22
3.7.2. Durchführung	22
3.8. Fluoreszenzmarkierung.....	23
3.8.1. Markierung des Blutplasmas	23
3.8.2. Markierung der Leukozyten	23
3.9. Intravitalmikroskopischer Messplatz	23
3.9.1. Mikroskop	24

3.9.2.	Lichtquelle.....	24
3.9.3.	Objekttisch	24
3.9.4.	Detektionseinheit.....	25
3.9.5.	Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie	25
3.10.	Auswertesysteme	26
3.10.1.	Fotosoftware.....	26
3.10.2.	CapImage	26
3.11.	Messparameter	26
3.11.1.	Makroskopische TumorgroÙe	26
3.11.2.	Mikrozirkulatorische Messparameter.....	27
3.11.3.	Messparameter der Leukozyten-Endothelzellinteraktion.....	29
3.12.	Versuchsprotokolle.....	29
3.12.1.	Welchen Effekt haben statische Magnetfelder auf LLC-1-Tumoren <i>in vivo</i> ?	30
3.12.2.	Welchen Effekt hat eine fraktionierte Magnetfeldexposition gegenüber statischen Magnetmagnetfeldern auf LLC-1-Tumoren <i>in vivo</i> im Vergleich zu einer unfraktionierten Exposition?	30
3.12.3.	Welchen Effekt hat Cetuximab auf LLC-1 <i>in vivo</i> ?	31
3.12.4.	Welchen Effekt hat eine unfraktionierte beziehungsweise fraktionierte Magnetfeldtherapie auf die Cetuximab-Therapie bei LLC-1 <i>in vivo</i> ?	31
3.12.5.	Gibt es Hinweise auf immunologische Reaktionen gegen Cetuximab im Mausmodell?	33
3.13.	Datenverarbeitung und Statistik.....	34
4.	ERGEBNISSE.....	36
4.1.	Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere [g]	36
4.2.	Einfluss der unfraktionierten und fraktionierten Magnetfeldtherapie auf LLC-1-Tumoren.....	37
4.2.1.	Tumorfläche [mm ²]	38
4.2.2.	Mikrohämodynamik	39
4.2.3.	Leukozythen-Endothelzell-Interaktion.....	42
4.3.	Einfluss von Cetuximab als Monotherapie sowie in Kombination mit unfraktionierter und fraktionierter Magnetfeldexposition auf LLC-1-Tumore <i>in vivo</i>	45

4.3.1.	Tumorfläche [mm ²]	46
4.3.2.	Mikrohämodynamik	48
4.3.3.	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	51
4.4.	Evaluierung möglicher immunologischer Reaktionen gegen Cetuximab im Mausmodell	54
4.4.1.	Tumorfläche [mm ²]	55
4.4.2.	Mikrohämodynamik	56
4.4.3.	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	58
5.	DISKUSSION	62
5.1.	Diskussion der Methodik	62
5.1.1.	Das Rückenhautkammermodell	62
5.1.2.	Das Lewis Lung Karzinom (LLC-1)	63
5.1.3.	Das statische Magnetfeld	64
5.1.4.	Der EGFR-Antikörper Cetuximab	64
5.1.5.	Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie	65
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	66
5.2.1.	Einfluss der unfraktionierten und fraktionierten Magnetfeldtherapie auf LLC-1 Tumoren	66
5.2.2.	Der Einfluss einer Magnetfeldexposition auf die Cetuximabtherapie bei LLC-1-Tumoren	71
5.2.3.	Evaluierung möglicher immunologischer Reaktionen gegen Cetuximab im Mausmodell	75
6.	ZUSAMMENFASSUNG	79
7.	LITERATURVERZEICHNIS	82
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	102
9.	TABELLENVERZEICHNIS	104
10.	DANKSAGUNG	105
11.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	107

1. EINLEITUNG

1.1. Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

Die Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region stellen 6% aller Neoplasien dar und stehen somit weltweit an Platz sechs der Krebserkrankungen [1, 2]. Aufgrund der Entwicklungen der letzten Jahre ist ein weiterer Anstieg der Inzidenz in den nächsten Jahren abzusehen [3].

Die Therapie maligner Tumoren im Kopf-Hals-Bereich verfolgt primär einen kurativen Ansatz. Abhängig von Größe und Lokalisation des Tumors, dessen Operabilität, histologischen Aspekten und dem Metastasierungsgrad wird unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes und des Behandlungswunsches des Patienten interdisziplinär ein individueller Therapieplan erstellt. Hierbei bedient man sich der drei Grundsäulen der Tumorthherapie: chirurgische Resektion, Strahlentherapie und Chemotherapie [4].

Zudem steht seit einigen Jahren auch eine molekulare Therapieoption mittels Antikörper ergänzend zu Verfügung. Der Einsatz zielgerichteter („targeted“) Therapien bei der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren ist vergleichsweise jung: Seit 2006 ist in Europa der Einsatz des monoklonalen Antikörpers Cetuximab (Erbix®) in Kombination mit einer Strahlentherapie zugelassen und seit 2008 auch in Kombination mit platinbasierten Chemotherapien [4, 5].

Trotz der Verbesserung der diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen hat sich die Prognose für Patienten, die an Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs leiden, in den letzten Jahrzehnten kaum gebessert: Das durchschnittliche 5-Jahres-Überleben liegt bei 33-62%. Hinzu kommen eine weiterhin hohe Rezidivrate von bis zu 61% sowie das häufige Auftreten von Zweittumoren bei ungefähr 10% der Patienten. Aufgrund von Vorbehandlungen sind hier häufig die Therapieoptionen bereits voll ausgeschöpft oder nur noch eingeschränkt möglich. Der demographische Wandel sowie die besseren Therapiemöglichkeiten zahlreicher anderer Krankheiten führen zudem zu einem immer größeren Patientenkollektiv, das den herkömmlichen, nebenwirkungsreichen Therapieoptionen aus Gründen eines zu schlechten Allgemeinzustandes nicht zugeführt werden können. Aktuell verstirbt daher ungefähr die Hälfte aller Kopf-Hals-Tumor-Patienten an ihrer Erkrankung. [4, 6]

Die Etablierung neuer und verträglicherer Therapieoptionen ist somit von großer Wichtigkeit.

1.2. Tumor Targeting („targeted therapy“) mit Cetuximab

Beim Tumor Targeting (oder englisch „targeted therapy“) wird die zielgerichtete und selektive Zerstörung von Tumorzellen angestrebt, um einen großen therapeutischen Effekt bei besserer Schonung des gesunden Gewebes und geringem Nebenwirkungsprofil zu erwirken. Der einzige in Deutschland zugelassene Wirkstoff dieser Art zur Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich ist derzeit der monoklonale Antikörper Cetuximab (Erbix®) [4, 6, 7]. Dessen Zielstruktur, der Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGF-Rezeptor), ist bei 95-100% der Kopf-Hals-Tumoren überexprimiert [7-9].

Cetuximab bindet an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors und wird anschließend als Cetuximab-EGFR-Komplex internalisiert. Da der pH-Wert der Endosomen nicht ausreicht, die starke Bindung des Komplexes zu lösen, erfolgt der lysosomale Abbau, woraus eine Abnahme der EGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche resultiert. Insgesamt senkt Cetuximab somit die Wahrscheinlichkeit einer Aktivierung des EGF-Rezeptors durch seine natürlichen Liganden und aller hierdurch initiierten und vornehmlich über intrazelluläre Signalkaskaden vermittelte Prozesse [10-13]. Beispielsweise kommt es zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase. In dieser Zellzyklusphase sind Zellen sensibler für eine Bestrahlung bei gleichzeitig herabgesetzter Fähigkeit zur Reparatur postradiogener Schäden, wodurch die Wirksamkeit einer Strahlentherapie begünstigt wird [14-16]. Auch die Wirksamkeit von Chemotherapien wird hierdurch gesteigert [16, 17]. Des Weiteren führt eine Hemmung der VEGF-Expression zu einer verminderten Tumorangiogenese [14, 16]. Die Apoptoserate ist durch Bildung proapoptotischer Moleküle dagegen gesteigert [16, 18]. Zusätzlich stellt die Abnahme der EGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche ein proapoptotisches Signal dar [13, 19]. *In vitro* konnte auch eine Antikörper-vermittelte Zytotoxizität mit konsekutiver Zellyse nachgewiesen werden [20, 21]. Die komplementinduzierte Zytotoxizität fällt *in vivo* und *in vitro* lediglich mild aus [13, 20, 21]. Insgesamt bewirkt Cetuximab somit eine Hemmung der Tumorprogression, der Metastasierungstendenz und der Invasivität sowie eine Steigerung der Wirksamkeit von Strahlen- und Chemotherapien.

Allerdings zeigt die Monotherapie mit Cetuximab nur geringe Effekte [7, 22]. Zudem hat die klinische Anwendung ergeben, dass Krebszellen in der Lage sind, Resistenzen auszubilden [23, 24]. Daher wird Cetuximab in Kombination mit Radiotherapieschemata und platinhaltiger Chemotherapien eingesetzt [4, 6, 7, 22-24]. Da strahlentherapeutische Optionen bei Rezidivtumoren häufig ausgeschöpft sind, wäre ein gut verträglicher, alternativer

Therapiepartner wünschenswert, zumal die Nebenwirkungen konkomitanter Chemo- oder Radiotherapien durch Cetuximabgabe verstärkt werden [25].

1.3. Magnetische Felder

Nach bisherigem Stand der Forschung werden wir Menschen durch das Erdmagnetfeld nicht wesentlich beeinflusst. Allerdings konnte eine Auswirkung stärkerer Magnetfelder, wie sie beispielsweise in der Magnetresonanztomographie angewandt werden oder durch elektrische Geräte und Hochspannungsleitungen entstehen, auf einzelne Zellen, Zellverbände und Organismen nachgewiesen werden.

In Abhängigkeit vom Zelltyp, dem Alter der Zellen und der Zellzyklusphase konnten hierbei durch Magnetfelder Einflüsse auf Zellmembranen sowie deren Ionenkanäle [26-31], die Zelldifferenzierung [28], die Zell-Zell-Erkennung [28, 32], unterschiedliche Zelleigenschaften wie die Phagozytosefähigkeit, die Zellproliferation oder die Zellorientierung [28, 29, 32-35] und auch auf zelluläre Signalkaskaden [29, 36] beobachtet werden. Dies führte zu einem geänderten Wachstums- und Apoptoseverhalten [28, 33, 37-42]. Für die zu beobachtenden Effekte waren hierbei sowohl die Art des Magnetfeldes als auch die Feldstärke und die Expositionsdauer von entscheidender Bedeutung.

Auf mikrozirkulatorischer Ebene konnten im Besonderen Effekte auf den Blutfluss und die Ausbildung von Umgehungskreisläufen erkannt werden. Neben Art und Stärke des Magnetfeldes beeinflusste auch die Ausrichtung der Blutgefäße im Magnetfeld die Beobachtungen [43-46].

Zudem wurde durch magnetische Felder eine Veränderung der Angiogeneseaktivität und des Vaskularisierungsmusters gesehen, welche unter anderem in Zusammenhang mit einer Beeinflussung des Aktivierungsgrades und der Expression des VEGF-Rezeptors gesehen wurden [47-52].

Den Anstoß zur vorliegenden Arbeit lieferten allerdings die Forschungsergebnisse zur Wirkung von Magnetfeldern auf malignes Gewebe: An menschlichen Brustkrebszellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein statisches Magnetfeld von 0,2 Tesla (T) zu einer vorübergehenden Verlangsamung des Zellwachstums führt und die Effekte einer Vitamin D-Therapie beeinflussen kann [53]. Raylman *et al.* konnten in *in vitro*-Versuchen ebenfalls eine Hemmung des Tumorwachstums durch statische Magnetfelder nachweisen [54]. Hierzu wurden verschiedene Tumorzelllinien über einen Zeitraum von 64 Stunden einem Magnetfeld von 7 T

ausgesetzt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte abhängig von der Tumorentität ein vermindertes Tumorwachstum von 19% bis 40 % gemessen werden. Der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus konnte zwar nicht erkannt werden, allerdings schienen weder eine Störung des Zellzyklus noch eine DNA-Fragmentierung ursächlich. In Adenokarzinomzelllinien des Kolons und der Brustdrüse konnten Tofani *et al.* neben einem verminderten Tumorwachstum auch eine erhöhte Apoptoserate nachweisen, wohingegen auf nichttransformierte embryonale Lungenfibroblasten kein Effekt gesehen wurde [55]. Ein reduziertes Tumorwachstum aufgrund alleiniger Magnetfeldtherapien *in vitro* konnte auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden [56, 57].

Von noch größerer Bedeutung hinsichtlich eines möglichen klinischen Einsatzes von Magnetfeldern in der Tumorthherapie sind allerdings die Ergebnisse aus verschiedenen *in vivo* Studien: Strieth *et al.* erforschten die Einflüsse von statischen Magnetfeldern auf die Mikrozirkulation an amelanotischen Melanomen beim Hamster [58]. Hierbei zeigte sich eine reversible Abnahme der Fließgeschwindigkeit sowie der funktionellen Gefäßdichte während der Exposition. Zudem konnte eine von der Expositionsdauer abhängige Zunahme der Thrombozythen-Endothelzell-Interaktion beobachtet werden. In Folgeversuchen wurden die Effekte einer prolongierten Magnetfeldexposition untersucht [59]. Hierbei wurden die Tiere jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach Tumoringokulation für 3 Stunden einem statischen Magnetfeld von 586 Millitesla (mT) ausgesetzt. Neben einer Abnahme der funktionellen Gefäßdichte und der Fließgeschwindigkeit konnte auch eine Abnahme der Gefäßdurchmesser beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich insgesamt eine Abnahme der Tumorgröße. Zudem wurde ein peri- und intratumorales Ödem beobachtet, welches auf eine erhöhte Gefäßpermeabilität schließen ließ. Dies wiederum ließ einen positiven Effekt einer Magnetfeldexposition auf die Paclitaxeltherapie vermuten, welcher sich auch bestätigte [60]. Tofani *et al.* wiederum konnten ein prolongiertes Überleben von Mäusen mit Adenokarzinomen des Kolons in Folge einer Magnetfeldexposition beobachten [61]. Es zeigte sich ein vermindertes Tumorwachstum mit geringerem mitotischem Index und herabgesetzter Proliferationsrate. Die Apoptoserate hingegen war gesteigert, was mit einer erniedrigten p53-Expression in Verbindung gebracht werden konnte [61]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Magnetfeldexposition mit bereits etablierten chemotherapeutischen Verfahren kombiniert und die Überlebenszeit gemessen [62]. Bei der Therapie des Lewis lung carcinoma (LLC) konnte hierbei ein additiver Effekt der Cisplatintherapie in Kombination mit der Magnetfeldtherapie gesehen werden. Eine Kombinationstherapie aus Cyclophosphamid und einer Magnetfeldexposition beim

melanotischem Melanom erbrachte jedoch keinen Vorteil gegenüber den Monotherapien. Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine bessere Wirksamkeit etablierter Chemotherapien durch eine Kombination mit Magnetfeldern beobachten und somit teilweise auch die wirksame Therapiedosis reduzieren [56, 63-66]. Andere Studien hingegen beschreiben abhängig vom verwendeten Chemotherapeutikum teils synergetisch, teils additive und teils auch fehlende Effekte durch eine Kombination mit Magnetfeldtherapien [67]. Der Pathomechanismus dieser teilweise widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Mehrfach wurden jedoch eine Änderung der Zellultrastrukturen und der Membranpermeabilität sowie eine gesteigerte DNA-Brüchigkeit und der Arrest in bestimmten Zellzyklusphasen durch eine Therapie mit Magnetfeldern beschrieben [63, 65, 68, 69]. Ein weiterer, vielversprechender therapeutischer Einsatz von Magnetfeldern ist das „magnetic drug targeting“, der Bindung antitumoraler Agenzien an magnetische Partikel beziehungsweise deren Verpackung in magnetischen Liposomen. Hiermit lassen sich die antitumoralen Substanzen mittels auf den Tumor gerichteter Magnetfelder zielgerichtet an den Wirkort bringen. Mithilfe des „magnetic drug targetings“ wurden ein signifikanter Rückgang von Metastasen und sogar vollständige, anhaltende Remissionen erzielt [70-74].

1.4. Magnetfelder und EGF-Rezeptoren

Für Magnetfelder sind selbst bei vergleichsweise hohen Feldstärken, wie sie beispielsweise in Magnetresonanztomographen angewandt werden, kaum Nebenwirkungen beschrieben. Dennoch konnten neben Auswirkungen auf zellulärer, mikrozirkulatorischer und angiogenetischer Ebene auch therapeutisch nutzbare Effekte auf verschiedene maligne Gewebe nachgewiesen werden. Zusätzlich ließ sich eine Beeinflussung auf verschiedene medikamentöse Tumorthapien zeigen. Daraus entwickelte sich die grundlegende Idee der vorliegenden Arbeit, eine Kombinationstherapie von Magnetfeldexposition und EGFR-Targeting zu untersuchen. Bei der Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs, zeichnet sich die „targeted therapy“ mittels Cetuximab, einem gegen den EGF-Rezeptor gerichteten Antikörper, zwar durch eine gute Verträglichkeit, jedoch auch durch eine eingeschränkte Wirksamkeit bei der Anwendung als Monotherapie aus. *In vitro* wurde bereits eine Beeinflussung des EGF-Rezeptors durch magnetische Felder beschrieben: Jia *et al.* konnten zeigen, dass ein Magnetfeld von 50 Hz und 0,4 T offensichtlich zu einem Verlust der Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors und somit zu einer Beeinflussung der EGFR-Signalkaskade führt [36]. Die Arbeitsgruppe um Zhang

et al. konnte nachweisen, dass statische Magnetfelder eine Umorientierung des EGF-Rezeptors bewirken und diesen somit direkt hemmen [75]. Entsprechend reduzierte ein 9 T Magnetfeld die Proliferation EGFR-exprimierender Zellen deutlich, wohingegen die Proliferation nicht EGFR-exprimierender Zellen kaum beeinflusst wurde.

Inwiefern diese Beobachtungen auch *in vivo* auftreten und welche Folgen die Interaktion zwischen EGF-Rezeptor und Magnetfeldern am lebenden Organismus haben, ist bislang nicht untersucht. Daher schien die Analyse einer Kombination der Cetuximabtherapie mit einer Magnetfeldexposition vielversprechend.

2. FRAGESTELLUNG

In der vorgelegten Arbeit sollte zunächst der Einfluss statischer Magnetfelder auf Plattenepithelkarzinome *in vivo* im Mausmodell untersucht werden. Plattenepithelkarzinome stellen den Löwenanteil an Malignomen im Kopf-Hals-Bereich dar und sind insbesondere in Rezidivsituationen mit herkömmlichen Therapieverfahren häufig nicht mehr kurativ behandelbar. In diesen Fällen wäre die Entwicklung neuartiger Therapiekonzepte sehr wünschenswert. Vor diesem Hintergrund ist die Analyse, ob der viel versprechende Ansatz einer Magnetfeldtherapie prinzipiell auch bei Plattenepithelkarzinomen wirkt, von großem Interesse. Zudem sollte, analog zur Strahlentherapie, in der unterschiedliche Fraktionierungsschemata zur Anwendung kommen, untersucht werden, ob die Dauer und die Frequenz der Magnetfeldexposition von Bedeutung sind.

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit soll sich der Frage widmen, ob die bei Rezidiv-Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region bereits etablierte EGFR-Targeted-Therapie mittels Cetuximab durch eine Kombination mit Magnetfeldexposition optimiert werden kann. Diese Frage stellt sich vor dem Hintergrund mehrerer *in vitro*-Studien, wonach eine Magnetfeldexposition zu einer Konformitätsänderung des EGF-Rezeptors führt und damit dessen untergeordnete Signalkaskaden beeinflusst.

Cetuximab wurde zur Anwendung an humanen Zellen entwickelt. Im Rahmen von Zulassungsstudien wurde die Bindung des Antikörpers an Geweben anderer Spezies untersucht, wobei eine Bindung an murine Zellen nicht nachgewiesen werden konnte [76, 77]. Bei allen Studien handelte es sich um *in vitro*-Studien an nichtmalignen Geweben mit insgesamt niedrigen Fallzahlen von jeweils $n=2$. Untersuchungen *in vivo* sowie an murinen Malignomzellen fehlen bisher. Trotz möglicherweise fehlender Wirksamkeit von Cetuximab auf LLC-1-Tumoren sollte ein Therapieversuch erfolgen, zumal für die Versuche ein muriner therapeutischer EGFR-Antikörper nicht zur Verfügung stand.

Da es sich bei Cetuximab um einen chimären Antikörper mit einer murinen und einer humanen Domäne handelt, ist eine Immunreaktion im Mausmodell gegen den humanen Anteil des Antikörpers denkbar. Zum Ausschluss einer Beeinflussung der Ergebnisse aufgrund immunologischer Effekte erfolgten daher einzelne Versuche an immundefizienten Mäusen.

Neben der Tumorgröße als Maß für die Wirksamkeit der Therapie wurden verschiedene mikrozirkulatorische Parameter als Hinweis auf mögliche angiogenetische Effekte erhoben.

Im Wesentlichen lässt sich die Zielsetzung der vorgelegten Arbeit wie folgt zusammenfassen:

1. Beeinflusst eine Magnetfeldexposition das Wachstum von LLC-1-Tumoren *in vivo*?
2. Wie wirkt sich unterschiedliche Fraktionierung der Magnetfeldexposition auf das Tumorwachstum bei LLC-1 *in vivo* aus?
3. Welchen Einfluss hat Cetuximab auf LLC-1-Tumore *in vivo*?
4. Welchen Effekt hat eine Magnetfeldexposition in unterschiedlichen Fraktionierungsschemata auf die Cetuximabtherapie bei LLC-1 *in vivo*?
5. Gibt es Hinweise auf immunologische Reaktionen gegen den chimären Antikörper Cetuximab im Mausmodell?

3. MATERIAL UND METHODEN

Die Versuche wurden von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen AZ 55.2-1-54-2532-97-10 genehmigt und im Zeitraum von März 2011 bis März 2012 am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. Pohl durchgeführt.

3.1. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an weiblichen C57/Bl6-Mäusen sowie an weiblichen CD1nu/nu Nacktmäusen von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Das mittlere Körpergewicht betrug 26,0- 29,7 g (C57/Bl6 Mäuse) beziehungsweise 25,6- 29,4 g (CD1nu/nu Mäuse) bei einem Alter von 11 bis 13 Wochen.

3.2. Versuchstierhaltung

Die Tiere wurden in Einzelkäfigen mit Zugang zu standardisiertem Trockenfutter (ssniff® GmbH; Soest, Deutschland) und Leitungswasser *ad libitum* gehalten. Als Einstreu wurden Sägespäne verwendet.

Im Tierstall herrschten bei 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus eine Umgebungstemperatur von 24 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 50%.

Zur Erleichterung des Anwachsens der Tumorzellen wurden die Tiere nach der Inokulation der Tumorzellen für drei Tage in einem Intensivpflege-Inkubator (Modell 7510; Dräger-Werk AG; Lübeck, Deutschland) gehalten. Dies ermöglichte eine Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 32 °C.

Zur Kontrolle des Ernährungszustandes wurde das Körpergewicht ab Beginn des Versuches regelmäßig auf einer Kleintierwaage (Mettler, Schweiz) ermittelt. Des Weiteren wurden Tiere, die in ihrem Verhalten oder vom Aspekt her Anzeichen herabgesetzten Wohlbefindens zeigten, unabhängig vom Verlauf des Körpergewichts von den Versuchen ausgeschlossen.

3.3. Das Rückenhautkammermodell

Die Rückenhautkammer besteht aus zwei spiegelbildlich konstruierten Titanrahmen, zwischen denen die angehobene Rückenhautfalte fixiert wird. Die Rahmen haben ein Beobachtungsfenster, unter dem auf einer Seite die Rückenhautfalte präpariert wird. Nach Verschluss mit einem Deckglas kann die Muskulatur der gegenüberliegenden Seite der Rückenhautfalte durch das Fenster beobachtet werden.

Zur Implantation von Fremdgewebe kann das Deckglas entfernt werden. Nach einer Regenerationsphase von 24- 72 Stunden können am wachen Tier über mehrere Tage hinweg wiederholt Untersuchungen durchgeführt werden, ohne dass hierfür ein erneutes Trauma gesetzt werden muss [78].

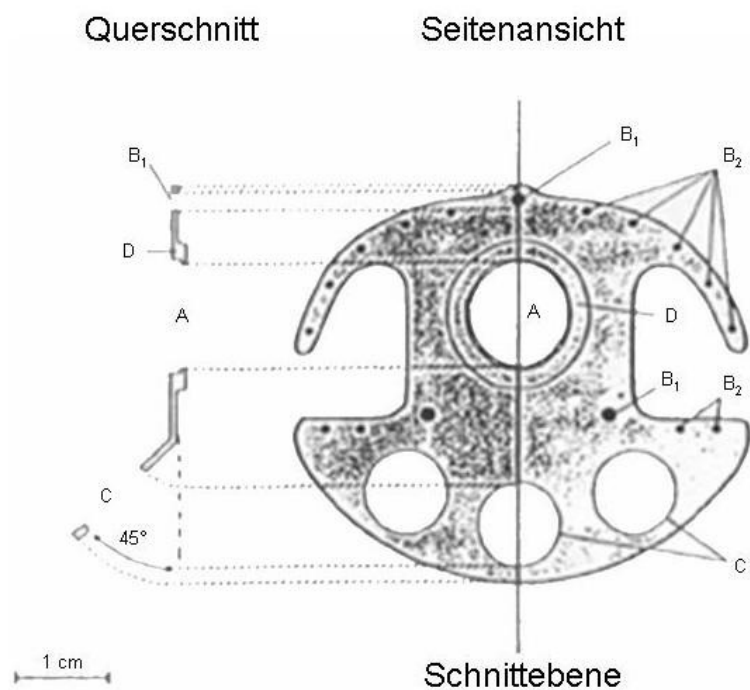


Abbildung 1: nach A. Götz [79]: Skizze eines Rückenhautkammerrahmens; Das Modell setzt sich aus spiegelbildlich konstruierten Titanrahmen zusammen, die durch Schrauben zusammengehalten werden

A= Beobachtungsfenster; B₁= Bohrung für Verbindungsschraube; B₂= Bohrungen für Fixationsfäden; C= Materialaussparung zur Reduzierung des Kammergewichts; D= Kammerring zur Fixation des Deckglases

Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (Ketavet; Pharmacia GmbH; Erlangen, Deutschland) und Xylazin (Rompun 0,2%; Bayer Vital GmbH; Leverkusen,

Deutschland), verdünnt mit 0,9%-iger NaCl-Lösung (Braun Melsung AG; Melsung, Deutschland), narkotisiert.

Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen-Salbe (Augen- und Nasensalbe; Bayer Vital GmbH; Leverkusen, Deutschland) bedeckt und das Tier anschließend auf eine warme Heizplatte gelegt, um ein Auskühlen zu verhindern.

Vor den weiteren Schritten und im Operationsverlauf wurde die Narkosetiefe mittels Überprüfung des Zwischenzehenreflexes getestet.

Das Fell im Operationsbereich wurde durch elektrische Rasur (Elektra GH 204; Aesculap; Tuttlingen, Deutschland) und chemische Epilation (Pilcamed; AsidBonz GmbH; Medi-Globe; Böblingen, Deutschland) entfernt. Anschließend wurde die Haut mit lauwarmem Wasser gereinigt und anschließend mit 70%-igem Alkohol desinfiziert.

Nach Anheben der Rückenhaul wurden die subkutan entlang der Schulterbasis verlaufenden Versorgungsgefäße diaphanoskopisch aufgesucht. Unter Schonung dieser Gefäße wurde die rückseitige Hälfte der Kammer implantiert und mit Seidefäden (Ethibond 5-0; Ethicon GmbH; Norderstedt, Deutschland) fixiert. Unter Transilluminationskontrolle zur Schonung größerer Gefäße konnte an der vorderen Haut das Beobachtungsareal angezeichnet werden. Im Bereich des Beobachtungsareals wurden Kutis, Subkutis mit Hautmuskulatur sowie beide Schichten des Musculus retractor unter dem Operationsmikroskop (Mikroskop M650; Wild Heerbrugg, Schweiz) präpariert, bis der Blick auf den Hautmuskel der Gegenseite frei war.

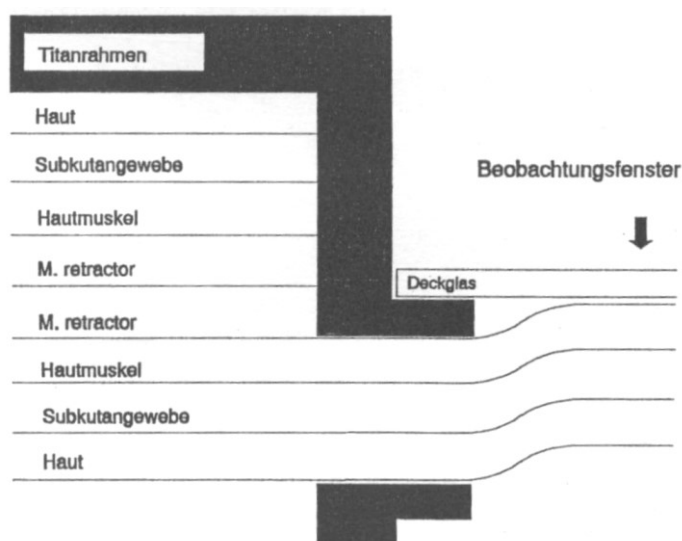


Abbildung 2: nach A. Götz [79]: Schematische Darstellung der Rückenhaulkammerpräparation mit den einzelnen Schichten der Rückenhaul

Anschließend wurde die Rückenhautkammer geschlossen, indem die vordere Hälfte der Kammer mittels Schrauben und Muttern an der hinteren, bereits fixierten Hälfte des Titanrahmens befestigt wurde. Zum Schutz des im Beobachtungsfenster präparierten, freiliegenden Gewebes wurde ein Deckglas (Edgar Hefele Medizin-Technik; München, Deutschland) über einen Sprengring am Titanrahmen der Kammer fixiert. Im letzten Operationsschritt wurden beide Kammerhälften mit Seidefäden (Ethibond 5-0; Ethicon GmbH; Norderstedt, Deutschland) an der Haut vernäht. Der gesamte Eingriff erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Die Rückenhautkammer wurde von den Tieren sehr gut toleriert, was sich in physiologischem Schlaf- und Fressverhalten sowie weiterhin bestehendem Spielverhalten zeigte.

Die Ein- bzw. Ausschlusskriterien nach der chirurgischen Kammerpräparation orientierten sich an den von Sewell geforderten Bedingungen [80]. Hiernach führten jegliche Anzeichen von Entzündung innerhalb der Kammer, Blutungen, traumainduzierte Neovaskularisierungen, Stase in den Blutgefäßen sowie Ödembildung zum Ausschluss des Tiere aus dem Versuch.



Abbildung 3: C57/Bl6-Maus nach Kammerimplantation

3.4. Tumormodell

Zur Untersuchung sollte ein bereits etabliertes und eingehend charakterisiertes Tumormodell verwendet werden, das nach Implantation zuverlässig und rasch in der Kammer anwächst.

3.4.1. Lewis Lung Karzinom (LLC-1)

1951 wurde das Lewis Lung Karzinom erstmals von Frau Dr. Margaret R. Lewis beschrieben. Es handelt sich hierbei um Tumorzellen, die aus einem spontan aufgetretenen Lungentumor bei C57/Bl6-Mäusen gewonnen wurden [81].

Die in dieser Arbeit verwendeten LLC-1-Zellen wurden 1980 aus Mäusen isoliert, denen zuvor ein primäres Lewis Lung Karzinom implantiert worden war [81].

Das LLC-1-Tumormodell ist bereits etabliert und die Zellen werden am Institut für chirurgische Forschung in Kultur gehalten.

3.4.2. Zellkultur

Zur Herstellung des Kultur- und Einfriermediums wurden 10 ml Penicillin/Streptomycin (PanSystems; Aidenbach, Deutschland) zu je 10^5 I.E. Penicillin und Streptomycin in einem Liter Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640; PanSystems; Aidenbach, Deutschland) gelöst. Dem Kulturmedium wurden zudem 10% fetales Kälberserum (FKS; PanSystems; Aidenbach, Deutschland) zugesetzt, dem Einfriermedium je 20% FKS und Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva; Heidelberg, Deutschland).

In das Kulturmedium wurden die Zellen zur *in vitro*-Passage suspendiert, anschließend in Zellkulturflaschen (Becton Dickison; Heidelberg, Deutschland) ausgesät und im Brutschrank (CO₂-Auto-Zero Typ B 5061 EK- 02; Heraeus; Hanau, Deutschland) bei 37 °C und 90% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Die Zellen wurden alle zwei Tage mit frischem Medium versorgt.

Zum Splitten der Zellen wurde zunächst das Kulturmedium mittels Inkubation in Trypsin/EDTA (PanSystems; Aidenbach, Deutschland) abgelöst. Durch erneute Zugabe von RPMI wurde das Trypsin schließlich wieder inaktiviert. Zur weiteren Züchtung wurden die Zellen nach Waschung auf neue Kulturflaschen verteilt.

Zur Vorbereitung auf die Kryokonservierung wurde die Zellsuspension wiederholt nach Abgießen des jeweiligen Überstandes für 10 Minuten bei 200 rpm zentrifugiert. Nach

Resuspension mit dem Einfriermedium (Herstellung siehe oben) wurden die Zellen in Cryoban Vials (NUNC; Langensfeld, Deutschland) nach schrittweiser Abkühlung in flüssigem Stickstoff bei -198 °C gelagert.

Für die Versuchsreihen wurden ausschließlich Zellen derselben Kulturpassage verwendet, um eine Vergleichbarkeit der Tumoren zu gewährleisten.

3.4.3. Vorbereitung der Tumorzellen zur Inokulation

Zum Auswaschen des Kulturmediums wurden die Zellen nach dem Auftauen in 50 ml Phosphatpuffer (PBS mit Kalzium und Magnesium; PanSystems; Aidenbach, Deutschland) suspendiert und für 10 Minuten bei 25 °C mit 2500 rpm zentrifugiert (Universal 30 RF; Hettich Zentrifugen; Tuttlingen, Deutschland). Nach Abgießen des Überstands wurde der Vorgang noch dreimal wiederholt, ehe das Pellet der Tumorzellsuspension in eine Tuberkulinspritze aufgenommen wurde.

3.4.4. Inokulation der Tumorzellen

Einen Tag nach der Präparation der Rückenhautkammer erfolgte die Implantation der Tumorzellen. Hierzu wurden die wachen Tiere in einer in Längsrichtung geschlitzten luftdurchlässigen Plexiglasröhre immobilisiert. Aus dem Schlitz der Plexiglasröhre, die an einem hierfür angefertigten Plastiktisch (Effenberg; München, Deutschland) fixiert wurde, ragte die Rückenhautkammer in waagerechter Ebene mit dem Sichtfenster nach oben. Dies ermöglichte eine Inokulation der Tumorzellen am wachen Tier unter dem Operationsmikroskop (Mikroskop M650; Wild Heerbrugg, Schweiz).

Nach gründlicher Desinfektion (Cutasept®; Bode Chemie; Hamburg, Deutschland) konnten Sprengring und Deckglas entfernt werden und ein Mikroliter der Tumorzellsuspension (ca. 2×10^5 Tumorzellen) aufgebracht werden. Anschließend wurde das Beobachtungsfenster mit einem frischen, sterilen Deckglas und dem Sprengring wieder verschlossen. Hierbei war darauf zu achten, die Haut ohne Einschluss von Luftblasen adhärent an das Deckglas zu legen.

3.5. Magnet

Das statische Magnetfeld wurde mithilfe eines NeFeB-Stabmagneten generiert, der uns von Prof. Dr. rer. nat. Gunnar Brix (Bundesamt für Strahlenschutz, Medizinische Strahlenhygiene und Dosimetrie, Neuherberg), Prof. Dr. rer. nat. Matthias Bellemann und Prof. Dr. rer. nat. Wilfried Andrä (Fachhochschule Jena, Fachbereich Medizintechnik) zur Verfügung gestellt wurde.

3.5.1. Magnetaufbau

Der Magnet bestand aus zehn einzelnen zylindrischen Komponenten, welche zusammengesetzt einen Durchmesser von 22,1 mm und eine Höhe von 10 mm ergaben und in der Summe eine sehr hohe magnetische Flussdichte aufwiesen. Die einzelnen Komponenten bestanden aus Neodymium-Eisen-Boron (NeFeB; 250/175h; Magnetfabrik Schramberg; Schramberg, Deutschland).

Die Aufsättigung aller NeFeB-Komponenten erfolgte in axialer Richtung unter Verwendung eines durch eine Spule erzeugten externen Magnetfeldes bei einer magnetischen Flussdichte von mindestens 8 T.

Ein großer Vorteil des hier verwendeten Stabmagneten bestand darin, dass eine Kühlung nicht erforderlich war und somit eine Vasokonstriktion als mögliche Störgröße ausgeschlossen werden konnte.

3.5.2. Magnetdosimetrie

Prof. Dr. rer. nat. Gunnar Brix führte die Magnetdosimetrie mit einer Hall-Sonde anhand eines digitalen Gaussmeters (FW-BELL 9950; Sphyris Test & Measurement; Orlando, Florida) durch. Über ein nicht-magnetisches Positionierungselement (Posab 2007; Berger Lahr; Lahr, Deutschland) konnte die Hall-Sonde automatisch in Schritten von minimal 0,075 mm in axialer und minimal 0,125 mm in radialer Richtung bewegt werden [82].

Die Verteilung der magnetischen Flussdichten axial und radial des Magneten zeigten eine starke Abnahme mit zunehmender axialer Entfernung, wohingegen die magnetische Flussdichte in radialer Entfernung zum Magneten nur minimal abnahm. Diese Messungen ließen eine annähernd konstante magnetische Flussdichte für das Areal des Beobachtungsfensters der Kammer vermuten. [82]

3.5.3. Magnetisierbarkeit im Setup

Die Kammerbestandteile waren aus den nichtmagnetisierbaren Metallen Titan und Messing gefertigt. Alle Vorrichtungen zur Immobilisation der Tiere während der Therapie mit dem statischen Magneten bestanden aus Plexiglas. So konnte sichergestellt werden, dass abgesehen von dem Stabmagneten keine signifikant magnetisierbaren Materialien im Setup verwendet wurden. Dies wurde bei der Etablierung des Versuch-Setups vor einigen Jahren mittels verschiedener Versuche bestätigt [43].

3.5.4. Versuchsaufbau

Zur Therapie mit dem statischen Magnetfeld wurden die in Plexiglasröhren immobilisierten Tiere zunächst mit dem Beobachtungsfenster nach oben so über dem Stabmagneten positioniert, dass sie einer Magnetfeldstärke von 0,587 T ausgesetzt waren (siehe Abb. 6). Die Magnetfeldstärke war zuvor mit der Hall-Sonde ermittelt worden.

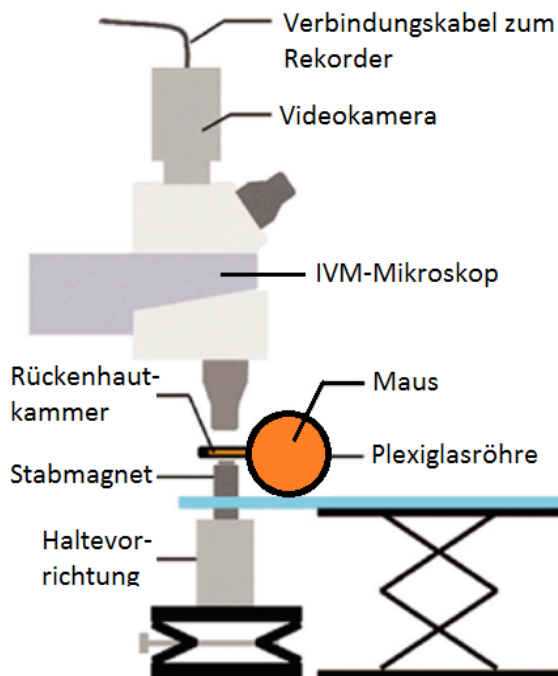


Abbildung 4: nach G. Brix [43, 79]: Schematische Darstellung des Versuchsplatzes

3.6. Cetuximab

In den Versuchen verwendetes Cetuximab (Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland) wurde von der Krankenhausapotheke des Klinikums Großhadern in einer Konzentration von 5 mg/ml bezogen und unter Wahrung der Kühlkette in 1ml-Spritzen geliefert. Die Spritzen wurden wie vom Hersteller empfohlen bei 2-8 °C gelagert und nach Anbruch binnen 24 Stunden verbraucht oder andernfalls verworfen.

3.6.1. Therapieplan

Nach gründlicher Literaturrecherche wurde ein Therapieplan mit Einzeldosen von 1 mg Cetuximab (entspricht 0,2 ml Injektionslösung) je Maus an den Tagen 3, 6 und 9 erstellt, wobei das Medikament intraperitoneal verabreicht wurde. Hierbei konnte eine ausreichende Therapiedosis ohne Gefahr einer Intoxikation angenommen werden. [83-85]

3.7. Makroskopische Dokumentation

Vor der Tumorinokulation sowie an den jeweiligen Versuchstagen wurden die Beobachtungsareale der Rückenhautkammern zur makroskopischen Dokumentation der Tumorgöße sowie des Zustandes der Rückenhautkammer fotografiert.

3.7.1. Makroskopischer Messplatz

Der makroskopische Messplatz setzte sich aus einem Makroskop (Leitz; Wetzlar, Deutschland) und einer Digitalkamera (Nikon CoolPix 995; Tokyo, Japan) zusammen.

3.7.2. Durchführung

Nach Immobilisation der Tiere wurde je eine Fotografie der Rückenhautkammer unter Auflicht und eine weitere unter Transillumination angefertigt. Bei der Einstellung des Zooms wurde darauf geachtet, das komplette Beobachtungsfenster inklusive Sprengring einzustellen, um bei der Auswertung der Tumorgöße den Sprengring als konstanten Maßstab nutzen zu können.

3.8. Fluoreszenzmarkierung

Bei der Fluoreszenzmarkierung werden Biomoleküle mit Fluorophoren markiert und anschließend mittels spezieller Fluoreszenzmikroskope visualisiert. Bei einem direkten Nachweis bindet das Fluorophor direkt an die gewünschte Zielstruktur, während bei einem indirekten Nachweis das Fluorophor an ein Molekül gebunden wird, welches dann an die Zielstruktur bindet [86, 87].

3.8.1. Markierung des Blutplasmas

Zur Visualisierung der Blutgefäße wurde Fluoreszein-Isothiocyanat-markiertes Dextran (FITC-Dextran; Sigma-Aldrich; Deisenhofen, Deutschland) mit einem Exzitationsmaximum von 490 nm und einem Emissionsmaximum von 520 nm verwendet. Das verwendete FITC-Dextran hatte ein Molekulargewicht von 500 kD.

Zur Quantifizierung der Mikrozirkulation *in vivo* wurde den Tieren 0,05 ml einer 0,5%-igen Lösung in 0,9% NaCl intravenös über eine Schwanzvene injiziert.

3.8.2. Markierung der Leukozyten

Die Leukozyten wurden mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin G6 (Sigma-Aldrich; Deisenhofen, Deutschland) markiert, der ein Exzitationsmaximum von 525 nm und einem Emissionsmaximum von 555 nm aufweist.

Rhodamin G6 akkumuliert in Mitochondrien. Da Mitochondrien in Erythrozyten nicht vorhanden sind, kann somit eine gezielte Markierung der Leukozyten erreicht werden [88].

Rhodamin G6 wurde als intravenöser Bolus von ca. 0,07 ml einer 0,5%-igen Lösung in 0,9% NaCl verabreicht.

3.9. Intravitalmikroskopischer Messplatz

Der intravitalmikroskopische Messplatz wurde unter funktionellen Aspekten gestaltet und bestand aus einer Einheit von Mikroskop, speziellem Objektisch, Quecksilberlampe und angeschlossener Aufnahmeeinheit.

3.9.1. Mikroskop

Zur Visualisierung wurde ein spezielles Intravitalmikroskop (Axiotech vario; Carl Zeiss; Göttingen, Deutschland) mit verschiedenen Objektiven (Plan- Neofluar® x4, x10 und x20; Carl Zeiss; Göttingen, Deutschland) verwendet.

Um bei gleicher Lichtquelle verschiedene Fluoreszenzmarkierungen darstellen zu können, wurden verschiedene Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter verwendet (Filterset 9 und 14; Carl Zeiss; Jena, Deutschland), die während des Versuchs gewechselt werden konnten. Die optischen Eigenschaften der verwendeten Filterblöcke sind in Abbildung 7 dargestellt.

Tabelle 1: Wellenlängenbereiche der verwendeten Anregungsfilter, Teilerspiegel und Sperrfilter (alle Bauteile Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

Filterblock	Markierter Zelltyp	Anregungsfilter (nm)	Tellerspiegel (nm)	Sperrfilter (nm)
10	RBC	BP* 450-490	FT* 510	BP* 515-565
14	WBC	BP* 510-560	FT* 580	LP* 590

* **BP**=Bandpassfilter; **LP**=Langpassfilter; **FT**= Farbteiler

3.9.2. Lichtquelle

Als Lichtquelle diente eine Quecksilber-Kurzbogenlampe (FluoArc; Zeiss; Jena, Deutschland). Die Lichtintensität konnte mittels Graufilter und Dimmung genau eingestellt werden.

3.9.3. Objektisch

Um im Verlauf wiederholt dieselben regions of interest (ROI) untersuchen zu können, wurde ein manuell steuerbarer x-y-Tisch mit integrierter fiberoptischer Durchlichtquelle (Märzhäuser; Wetzlar, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe der bei der ersten Untersuchung festgelegten Koordinaten konnte bei den Folgeuntersuchungen der entsprechende Bereich wieder aufgesucht werden.

3.9.4. Detektionseinheit

Mit Hilfe einer CCD-Videokamera (Sony XC-77CE; Sony; Köln, Deutschland) wurden die intravitalmikroskopischen Aufnahmen aufgezeichnet. Die so gewonnenen Bilder konnten direkt auf einem Monitor dargestellt werden und anhand der Bildqualität eine Feineinstellung der Sensitivität und Verstärkung der Kamera vorgenommen werden.

Ein angeschlossener digitaler Videorekorder (DSR-45P; Sony; Tokio, Japan) zeichnete die Aufnahmen auf.

Um Datum und Versuchszeitpunkt der Aufnahme zu dokumentieren, wurde zwischen Kamera und Rekorder ein Videozeitgenerator (VTG-33; FOR-A-Company Ltd; Tokio, Japan) geschaltet.

3.9.5. Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie

Nach Immobilisation der Tiere in der Plexiglasröhre erfolgte die Anlage eines Katheters in eine der beiden Schwanzvenen zur späteren Applikation der Fluoreszenzmarker. Hierzu diente eine sterile Einmalkanüle (Sterican 0,4 mm x 20 mm; B. Braun Medical AG; Emmenbrücke, Schweiz). Anschließend wurden die Tiere mit dem Beobachtungsfenster nach oben unter dem Intravitalmikroskop positioniert (siehe Abb. 6).

Nach der intravenösen Bolus-Applikation der Fluoreszenzmarker wurde eine Wartezeit von 5 Minuten eingehalten, um eine ausreichende Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe zu gewährleisten.

Mit Hilfe einer 4fachen Vergrößerung wurde mikroskopisch zunächst die Unversehrtheit der Kammerpräparation kontrolliert. Hieran schloss sich die randomisierte Markierung von sechs ROIs an, beziehungsweise – bei erneuter Messung zu einem späteren Versuchszeitpunkt- die erneute Aufsuchung der zuvor gewählten sechs ROIs.

Unter 20-facher Vergrößerung wurde von jedem ROI zunächst mit dem Filter 9 und anschließend mit dem Filter 14 eine Aufzeichnung über 30 Sekunden erstellt. Zwischen den Belichtungszeiten wurde zum Schutz vor phototoxischer Schädigung im Gewebe die Lichtquelle abgedeckt.

3.10. Auswertesysteme

Alle Parameter wurden offline nach Beendigung der Versuche verblindet ausgewertet.

3.10.1. Fotosoftware

Die Auswertung der Tumorfläche erfolgte planimetrisch mittels einer Bildanalysesoftware (KS400; Zeiss; Jena, Deutschland).

3.10.2. CapImage

Zur Auswertung der mikrozirkulatorischen Parameter wurde ein Bildanalyse-System (CapImage; Zeintl; Heidelberg, Deutschland) verwendet, das nach Verbindung mit dem Auswertecomputer die Messung der Parameter der Erythrozytenfließgeschwindigkeit, des Gefäßdurchmesser, der funktionelle Gefäßdicke sowie der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ermöglichte.

3.11. Messparameter

Zur Beurteilung der Therapieeffekte wurden neben der Tumorfläche als Maß für das Tumorstadium verschiedene mikrozirkulatorische Parameter erfasst, um hieraus gegebenenfalls Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus ziehen zu können.

3.11.1. Makroskopische Tumorgröße

Es wurde die Tumorfläche in mm^2 ermittelt. Da die Tumoren in der Rückenhautkammer zunächst vornehmlich oberflächlich wachsen und kaum Tiefenwachstum aufweisen, korreliert die Tumorfläche gut mit der eigentlichen Tumorgröße und lässt somit Rückschlüsse auf das Tumorstadium $[\Delta\text{mm}^2/\Delta d]$ zu.

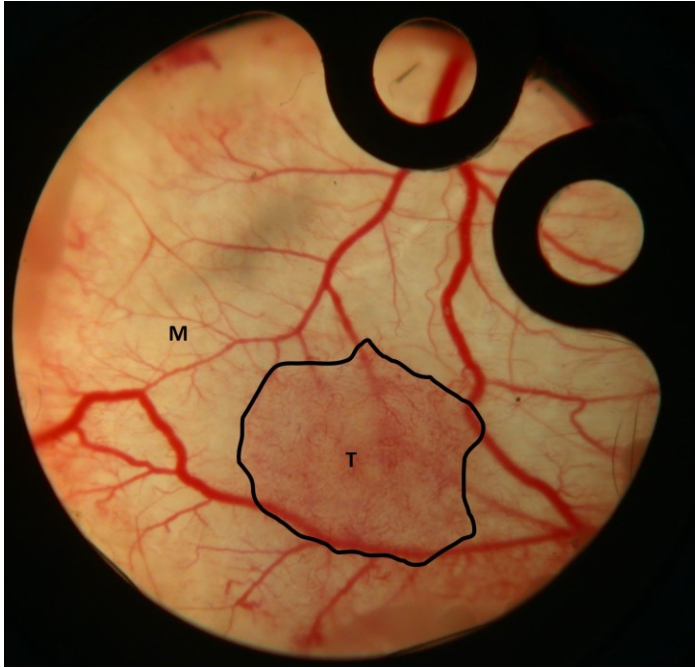


Abbildung 5: LLC-1 am 9. Tag nach Inokulation: Markierung des Tumorumfanges zur Ermittlung der Tumorgroße (T= Tumor; M= Musculus cutaneus maximus)

3.11.2. Mikrozirkulatorische Messparameter

Die folgenden mikrozirkulatorischen Messparameter konnten nach Fluoreszenzmarkierung des Blutplasmas erhoben werden

3.11.2.1. Erythrozytenfließgeschwindigkeit[mm/s]

Die Ermittlung der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten erfolgte durch das Bildanalyse-System CapImage mittels der Line-Shift-Diagramm-Methode [89].

Nach Fluoreszenzmarkierung des Plasmas zeichneten sich die korpuskulären Blutbestandteile, vor allem Erythrozyten, dunkel vor dem hell-fluoreszierenden Hintergrund ab und erzeugten somit Graustufen.

Nachdem mit dem Bildanalyse-System am stehenden Bild zunächst mehrere Gefäße mittels parallel zum Gefäßverlauf liegenden Linien markiert wurden, registrierte das Programm für einen Zeitraum von zehn Sekunden die Grauwerte jedes Halbbildes entlang der Linie um diese anschließend in einem Diagramm (x-Achse: Zeit; y-Achse: Messlinie) darzustellen. Die Grauwerte stellten sich im Verhältnis zur Zeit und der Messlinie als Geraden unterschiedlicher Steigung dar. Aus der Steigung konnte die Software die Fließgeschwindigkeit ($=ds/dt$) ermitteln.

3.11.2.2. *Gefäßdurchmesser[μm]*

Zunächst wurde im Standbild der Gefäßdurchmesser aller perfundierten Gefäße des ROIs senkrecht zur Fließgeschwindigkeit markiert. Die CapImage-Software errechnete hieraus einen Mittelwert.

3.11.2.3. *Funktionelle Gefäßdichte[mm^{-1}]*

Als funktionelle Gefäßdichte wird die Gesamtlänge aller perfundierten Gefäße bezogen auf ein Messareal bezeichnet. Hierzu wurden alle perfundierten Gefäße in einem zuvor festgelegten Bildausschnitt der Länge nach markiert. Anschließend konnte das Bildanalyseprogramm die Gefäßlänge in Abhängigkeit von dem gewählten Bildausschnitt berechnen.

Mit Hilfe dieses Parameters konnten Rückschlüsse auf Perfusionsausfälle im Rahmen einer Störung der Mikrozirkulation sowie auf Angiogeneseprozesse im Gewebe gezogen werden [90, 91].

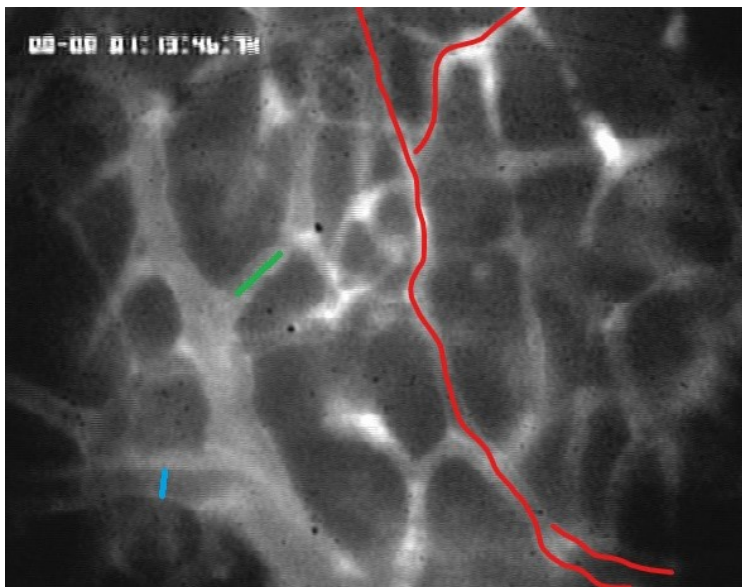


Abbildung 6: CapImage-Auswertung: grün: Markierung der Gefäße für die Ermittlung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit; blau: Markierung der Gefäße für die Ermittlung des Gefäßdurchmessers; rot: Markierung der Gefäße für die Ermittlung der funktionellen Gefäßdichte

3.11.3. Messparameter der Leukozyten-Endothelzellinteraktion

Zur Untersuchung der folgenden Parameter wurden die Videoaufnahmen nach Rhodamin 6G-Gabe herangezogen.

3.11.3.1. Leukozytenflux [n/s]

Definitionsgemäß handelt es sich hierbei um die Anzahl der Leukozyten, die einen bestimmten Gefäßabschnitt innerhalb einer Sekunde passieren. Zur Messung wurde eine imaginäre Linie senkrecht durch ein Gefäß gelegt und alle Leukozyten, die diese imaginäre Linie binnen 30 Sekunden überquerten, gezählt.

3.11.3.2. Leukozytenrolling [%]

Das Leukozytenrolling bezeichnet im Randstrom eines Gefäßes fließende Leukozyten, die sich mit maximal halber Geschwindigkeit im Vergleich zum zentralen Blutfluss bewegen. Das Phänomen kommt durch vorübergehende Interaktionen der Leukozyten mit dem Gefäßendothel zustande. Die Datenerhebung erfolgte identisch zur Messung des Leukozytenflux und wurde als Leukozytenrolling-Fraction im Verhältnis zu diesem angegeben.

3.11.3.3. Leukozytensticking [n/mm²]

Unter Sticking versteht man die Anzahl an adhärenenten Leukozyten, die sich während des Untersuchungszeitraumes von 30 Sekunden nicht von der Gefäßwand lösen, in Relation zur Gefäßoberfläche. Die Gefäßoberfläche errechnet sich aus dem Gefäßdurchmessers und der Gefäßlänge.

3.12. Versuchsprotokolle

Die Tumorinokulation erfolgte 24 Stunden nach Kammerpräparation und markierte den Tag null. An Tag drei wurden die Tiere randomisiert den verschiedenen Versuchsgruppen (n=6) zugeteilt. Die Gesamtdauer des Versuches betrug 15 Tage.

Die Tumorgröße wurde an den Tagen 3, 6, 9 und 13 erhoben; die intravitalmikroskopischen Messungen erfolgten an den Tagen 7 und 13.

An den Versuchstagen wurde darauf geachtet, die Untersuchungsdauer möglichst kurz zu halten und eine maximale Immobilisationsdauer von 5 Stunden nicht zu überschreiten.

Um phototoxische Effekte durch die Belichtung des Mikroskops nach Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen zu vermeiden, wurden Belichtungsdauer und -intensität gering gehalten.
[92-94]

3.12.1. Welchen Effekt haben statische Magnetfelder auf LLC-1-Tumoren *in vivo*?

Zunächst sollte der Einfluss statischer Magnetfelder auf das Tumorwachstum von LLC-1 *in vivo* untersucht werden.

Wie in der Einleitung bereits ausführlich dargelegt, lassen zahlreiche Untersuchungen einen therapeutischen Nutzen magnetischer Felder auf Tumorgewebe vermuten. Besonders im Kopf-Hals-Bereich wäre eine Magnetfeldtherapie durch den Einsatz von Kopfspulen gut denkbar.

Bisher gibt es keine Studien zur Untersuchung der Wirkung von statischen Magnetfeldern auf Plattenepithelkarzinome *in vivo*, sodass der im Folgenden beschriebene Versuchsaufbau konzipiert wurde.

An den Tagen 3, 6 und 9 wurden die Tumoren von 6 Tieren jeweils zwei Stunden einem statischen Magnetfeld von 0,587 T ausgesetzt (2hSMF). Als Kontrollgruppe dienten 6 Tiere, welchen ebenfalls an den Tagen 3, 6 und 9 für jeweils 2 Stunden immobilisiert wurden, allerdings außerhalb des statischen Magnetfeldes (Kontrolle).

Um die Tiere im weiteren Verlauf der Versuche als Vergleichstiere nutzen zu können, erhielten alle 12 Tiere an den Tagen 3, 6 und 9 0,2 ml NaCl intraperitoneal analog zur intraperitonealen Gabe von Cetuximab weiterer Tiere.

3.12.2. Welchen Effekt hat eine fraktionierte Magnetfeldexposition gegenüber statischen Magnetmagnetfeldern auf LLC-1-Tumoren *in vivo* im Vergleich zu einer unfraktionierten Exposition?

In der Strahlentherapie haben sich inzwischen Therapieschemata durchgesetzt, bei denen die Gesamtstrahlendosis auf mehrere Einzelgaben verteilt wird, was als Fraktionierung bezeichnet wird. Da Tumorzellen verglichen mit gesunden Zellen meist eine herabgesetzte Fähigkeit zur

Reparatur von Zellschäden haben, kann durch Fraktionierung die Gesamtdosis bei vermindertem Nebenwirkungsprofil gesteigert werden und somit die Tumorthherapie verbessert werden. [95, 96]

Die folgende Versuchsreihe diente der Untersuchung, ob eine Fraktionierung der Magnetfeldexposition einen Einfluss auf das Therapieergebnis hat.

Hierzu wurden sechs Tiere an den Tagen 3- 11 für jeweils 35 Minuten gegenüber einem statischen Magnetfeld von 0,587 T exponiert (35minSMF) und in der Auswertung anschließend mit den Tumoren der Versuchsgruppe aus 3.12.1. verglichen.

Zudem wurde den Tieren an den Tagen 3, 6 und 9 0,2 ml NaCl intraperitoneal verabreicht – erneut, um eine spätere Nutzung als Vergleichsgruppe zu den Cetuximab-therapierten Tieren zu ermöglichen.

3.12.3. Welchen Effekt hat Cetuximab auf LLC-1 *in vivo*?

In vitro wurde an verschiedenen murine Geweben eine fehlende Bindung von Cetuximab beschrieben [76, 77]. Untersuchungen *in vivo* sowie an murinem malignem Gewebe sind bislang nicht erfolgt. Zunächst sollte daher untersucht werden, ob Cetuximab das Wachstum von LLC-1 beeinflusst.

3.12.4. Welchen Effekt hat eine unfraktionierte beziehungsweise fraktionierte Magnetfeldtherapie auf die Cetuximab-Therapie bei LLC-1 *in vivo*?

Es gibt Hinweise, dass statische Magnetfelder die Gefäßpermeabilität erhöhen und die Effektivität kleinmolekularer Zytostatika steigern können [59, 60]. Zudem beeinflussen Magnetfelder die Struktur von Molekülen und ändern somit deren Eigenschaft [28, 31, 97, 98]. So erfährt auch der EGF-Rezeptor unter Magnetfeldexposition eine Konformationsänderung [36, 75], deren Relevanz *in vivo* bislang jedoch nicht untersucht wurde. Eine Bindung von Cetuximab an LLC-1-Zellen vorausgesetzt, könnte eine Konformationsänderung des EGF-Rezeptors induziert durch eine Magnetfeldexposition auch die Bindungsaffinität von Cetuximab an die LLC-1-Zellen beeinflussen.

Dementsprechend folgte eine weitere Versuchsgruppe, in welcher der Einfluss einer Kombination aus Magnetfeldexposition und Cetuximab-Therapie auf LLC-1-Tumoren untersucht wurde. Basierend auf den Überlegungen aus 3.12.2. sollte sowohl untersucht werden,

wie sich eine unfraktionierte Magnetfeldexposition auf die Cetuximab-Therapie auswirkt, als auch, wie sich dies unter der fraktionierten Exposition verhält.

Eine Versuchsgruppe von 6 Tieren erhielt an den Tagen 3, 6 und 9 1 mg Cetuximab (entsprechend 0,2 ml Injektionslösung) intraperitoneal und wurde im Anschluss sofort dem statischen Magnetfeld (0,587 T) für die Dauer von je 2 Stunden ausgesetzt (2hSMF+Cetuximab). Eine weitere Versuchsgruppe (n= 6) wurde an den Tagen 3- 11 jeweils 35 Minuten gegenüber einem statischen Magnetfeld von 0,587 T exponiert. Zusätzlich wurde den Tieren an den Tagen 3, 6 und 9 1 mg Cetuximab (entsprechen 0,2 ml Injektionslösung) intraperitoneal verabreicht (35minSMF+Cetuximab). Eine dritte Versuchsgruppe mit ebenfalls 6 Tieren erhielt zu den gleichen Zeitpunkten die gleiche Dosis an Cetuximab und wurde ebenfalls direkt im Anschluss für 2 Stunden immobilisiert, allerdings außerhalb des Magnetfeldes (Cetuximab). Als Kontrollgruppen dienten die Tiere aus Versuch 3.13.1., welche an den Tagen 3, 6 und 9 statt Cetuximab physiologische Kochsalzlösung im gleichen Injektionsvolumen intraperitoneal verabreicht bekamen (Kontrolle).

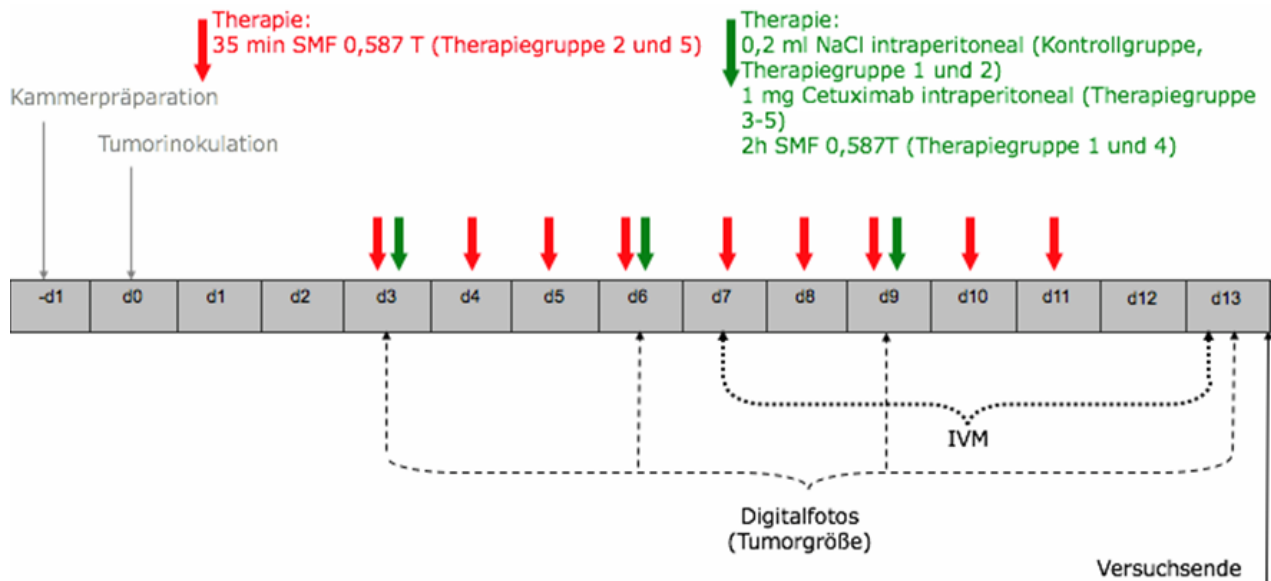


Abbildung 7: Zeitstrahl zu den Untersuchungen an immunkompetenten Tieren:

Kontrollgruppe (Kontrolle): Verabreichung von 0,2 ml NaCl intraperitoneal an den Tagen 3, 6 und 9

Therapiegruppe 1 (2hSMF): Verabreichung von 0,2 ml NaCl intraperitoneal und anschließende Magnetfeldexposition (0,587 T) für 2 Stunden an den Tagen 3, 6 und 9

Therapiegruppe 2 (35minSMF): Verabreichung von 0,2 ml NaCl intraperitoneal an den Tagen 3, 6 und 9 sowie Magnetfeldexposition (0,587 T) für 35 Minuten an den Tagen 3 bis 11

Therapiegruppe 3 (Cetuximab): Verabreichung von 1 mg Cetuximab intraperitoneal an den Tagen 3, 6 und 9

Therapiegruppe 4 (2hSMF+Cetuximab): Verabreichung von 1 mg Cetuximab intraperitoneal und anschließender Magnetfeldexposition (0,587 T) für 2 Stunden an den Tagen 3, 6 und 9

Therapiegruppe 5 (35minSMF+Cetuximab): Verabreichung von 1 mg Cetuximab intraperitoneal an den Tagen 3, 6 und 9 sowie Magnetfeldexposition (0,587 T) für 35 Minuten an den Tagen 3 bis 11

3.12.5. Gibt es Hinweise auf immunologische Reaktionen gegen Cetuximab im Mausmodell?

Die Untersuchungen wurden an CD1nu/nu Nacktmäusen durchgeführt. Aufgrund eines fehlenden Thymus können die Tiere keine T-Zellen bilden und sind daher immundefizient. Somit konnte eine Beeinflussung der Ergebnisse aufgrund immunologischer Effekte, die insbesondere aufgrund des chimären Aufbaus des Antikörpers Cetuximab vorstellbar wären, evaluiert werden.

Es wurden jeweils 6 Tiere randomisiert auf 2 Gruppen verteilt. An den Tagen 3, 6 und 9 wurde einer Gruppe 1 mg Cetuximab (entsprechen 0,2 ml Injektionslösung) intraperitoneal (CetuximabIS) verabreicht. Die Tiere der anderen Gruppe erhielten an denselben Tagen 0,2 ml

physiologische Kochsazlösung intraperitoneal (KontrolleIS). Beide Gruppen wurden nach der Injektion für 2 Stunden außerhalb des Magnetfeldes immobilisiert.

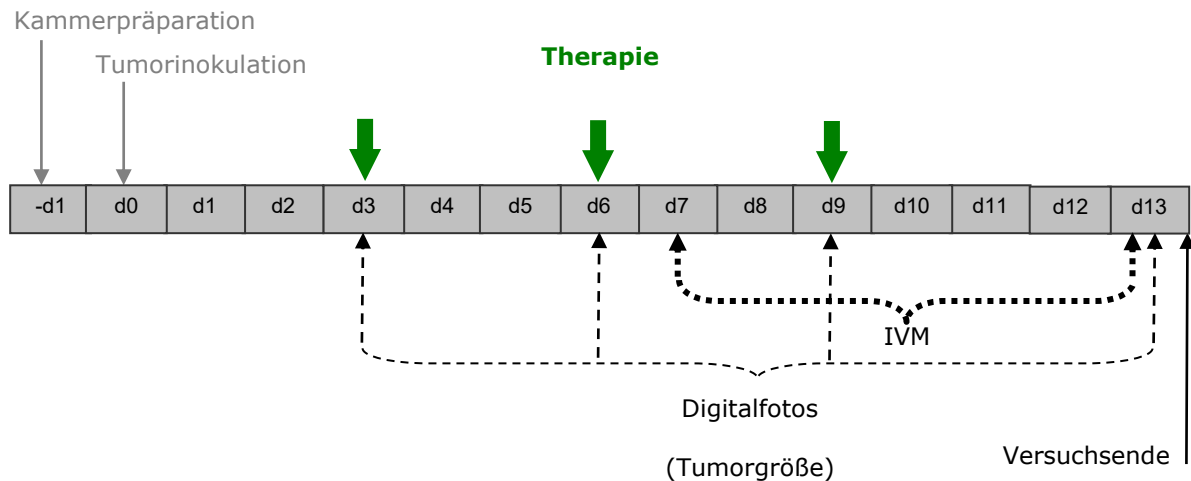


Abbildung 8: Zeitstrahl zu den Untersuchungen an immundefizienten Tieren:

Kontrollgruppe (KontrolleIS): Verabreichung von 0,2 ml NaCl intraperitoneal an den Tagen 3, 6 und 9

Therapiegruppe 1 (CetuximabIS): Verabreichung von 1 mg Cetuximab intraperitoneal an den Tagen 3, 6 und 9

3.13. Datenverarbeitung und Statistik

Die Datenanalyse erfolgte in Excel 2003 (Microsoft Corporation; Redmond, Vereinigte Staaten). Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde die Software SigmaPlot (Systat Software GmbH; Erkrath, Deutschland) verwendet. Die Entwicklung des Körpergewichts sowie der Tumorflächen wurde als Liniendiagramm unter Verwendung der Mittelwerte abgebildet. Zur Veranschaulichung der intravitalmikroskopisch erhobenen Parameter zur Mikrozirkulation und zur Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde ein klassischer Boxplot unter Verwendung des Medians, der beiden Quartile und der Extremwerte gewählt. Milde und extreme Ausreiser wurden mitabgebildet.

Die Berechnung der Analyse erfolgt mit IBM SPSS STATISTICS 22 (IBM; Armonk, New York).

Es wurden ausschließlich nichtparametrische Tests verwendet, da aufgrund der geringen Gruppenstärke keine Normalverteilung vorlag: Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen (Intergruppenvergleich) wurden mittels des Friedman- und des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-

Tests geprüft. Für die Testung auf statistische Unterschiede innerhalb der Gruppen (Intragruppenvergleich) wurden der Kruskal-Wallis sowie der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Lag die Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art bei weniger als 5 %, wurde eine Signifikanz angenommen (Signifikanzniveau $p < 0,05$). Diese wurde auch in den entsprechenden Abbildungen vermerkt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere [g]

Zur Erfassung des Gesundheitszustandes der Versuchstiere wurde unter anderem das Körpergewicht in Gramm kontrolliert.

Für die Kammerimplantation wird ein Hautvolumen benötigt, welches bei Mäusen mit Körpergewicht über 24 g sicher vorhanden ist. Vor der Kammerimplantation (an Tag -1) erfolgte die erste Gewichtskontrolle, um zu kleine Tiere von den Versuchen ausschließen zu können. Die Messungen an den Tagen 3, 6, 9 und 13 nach Tumorinokulation ermöglichten eine Beurteilung des Ernährungszustandes und somit des Wohlbefindens der Tiere während des Versuchszeitraumes.

Vor Versuchsbeginn zeigten alle Gruppen immunkompetenter C57/Bl6-Mäuse ein vergleichbares Ausgangsgewicht von durchschnittlich $27,42 \pm 0,95$ g. Die immunsupprimierten CD1nu/nu-Mäuse wiesen ein vergleichbares Körpergewicht von durchschnittlich $27,43 \pm 1,62$ g auf.

Zwischen Tag -1 und Tag 3 ergab sich in allen Gruppen ein signifikanter Gewichtsanstieg, welcher dem Gewicht der implantierten Kammer entsprach. Über den gesamten Therapiezeitraum von Tag 3 bis Tag 13 zeigte sich in keiner der untersuchten Gruppen eine signifikante Änderung des Gewichtes. Abb. 9.

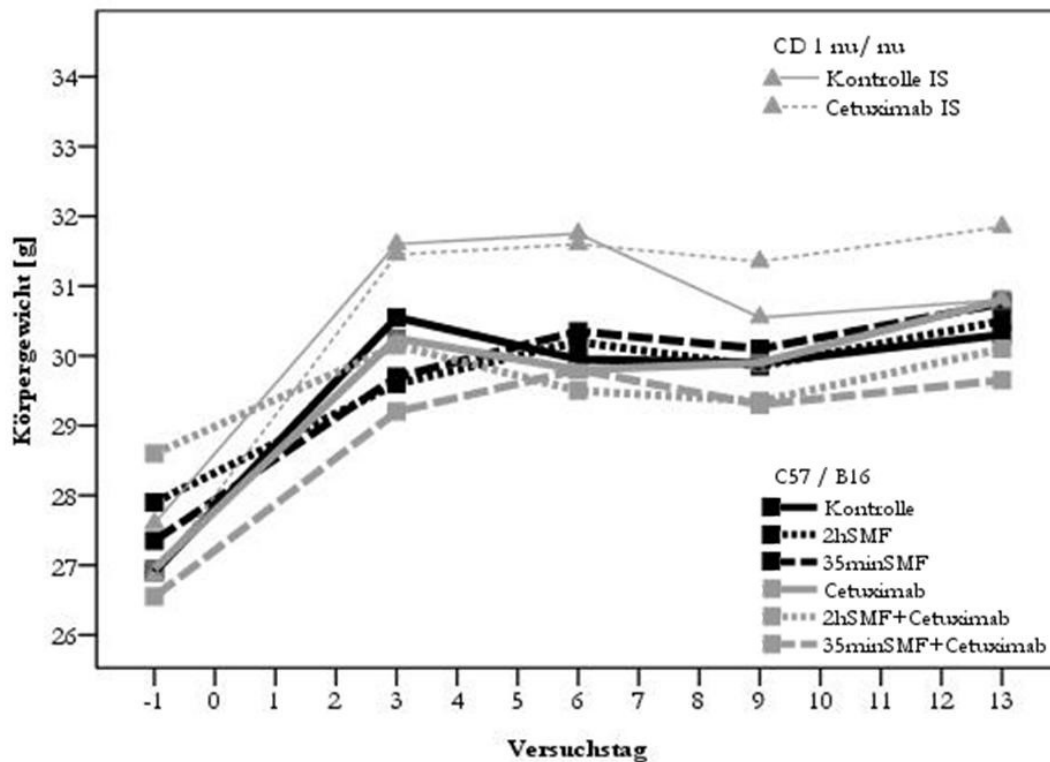


Abbildung 9: Entwicklung des Körpergewichts: Median als Messpunkt.

Es zeigen sich vergleichbare Körpergewichte aller Versuchsgruppen (je n=6) über den gesamten Versuchsverlauf, sowohl in den immunkompetenten als auch den immunsupprimierten Tieren. Der signifikante Gewichtsanstieg zwischen Tag -1 und Tag 3 ist durch das Eigengewicht der implantierten Rückenhautkammer bedingt.

4.2. Einfluss der unfraktionierten und fraktionierten Magnetfeldtherapie auf LLC-1-Tumoren

Das erste Ziel der Studie war die Untersuchung, ob das Tumorwachstum von LLC-1-Tumoren durch die Exposition gegenüber statischen Magnetfeldern beeinflusst wird und ob dabei der zeitliche Ablauf der Exposition von funktioneller Relevanz ist.

Hierzu wurden drei Versuchsgruppen gebildet: Die Tumore der ersten Versuchsgruppe wurden an den Tagen 3, 6 und 9 nach Tumorzellinokulation für je zwei Stunden einem statischen Magnetfeld von 0,587 T ausgesetzt (im Folgenden als „unfraktionierte“ Magnetfeldtherapie bezeichnet; 2hSMF; n=6), die Tumore der zweiten Versuchsgruppe an den Tagen 3 bis 11 für je 35 Minuten (im Folgenden als „fraktionierte“ Magnetfeldtherapie bezeichnet; 35minSMF; n=6) . Als Kontrollgruppe dienten Tumore, die zu keinem Zeitpunkt dem Magnetfeld ausgesetzt waren (Kontrolle; n= 6).

4.2.1. Tumorfläche [mm²]

An den Tagen 3, 6, 9 und 13 nach Tumorzellinokulation wurde die Tumorfläche digital fotografiert und anschließend planimetrisch erfasst, um das makroskopische Tumorwachstum zu beurteilen.

Unter Baseline-Bedingungen waren die Tumorgrößen der drei Versuchsgruppen weitgehend gleich groß mit durchschnittlich $4,24 \pm 2,28 \text{ mm}^2$. Innerhalb aller Gruppen kam es zwischen den Untersuchungstagen zu einer jeweils signifikanten Zunahme der Tumorgröße. Ab Tag 6 ergaben sich signifikante Gruppenunterschiede hinsichtlich der Tumorgröße: Zu diesem Zeitpunkt lagen für die Kontrollgruppe (Kontrolle: $5,6 \pm 3,9 \text{ mm}^2$) signifikant kleinere Tumorflächen vor als unter der fraktionierten Magnetfeldtherapie (35minSMF: $13,2 \pm 8,4 \text{ mm}^2$). Ab Tag 9 waren die Tumore unter der unfraktionierten Magnetfeldtherapie (2hSMF: $10,03 \pm 4,09 \text{ mm}^2$) signifikant kleiner als unter der fraktionierten Exposition (35minSMF: $21,16 \pm 8,49 \text{ mm}^2$). Dieser Effekt, dass die Tumoren unter unfraktionierter Magnetfeldtherapie signifikant kleiner waren als die Tumore der anderen beiden Versuchsgruppen, hielt bis an das Versuchsende an (2hSMF: $19,17 \pm 4,84 \text{ mm}^2$ vs. Kontrolle: $35,41 \pm 12,40 \text{ mm}^2$ und 35minSMF: $31,33 \pm 7,86 \text{ mm}^2$); siehe Abb. 10.

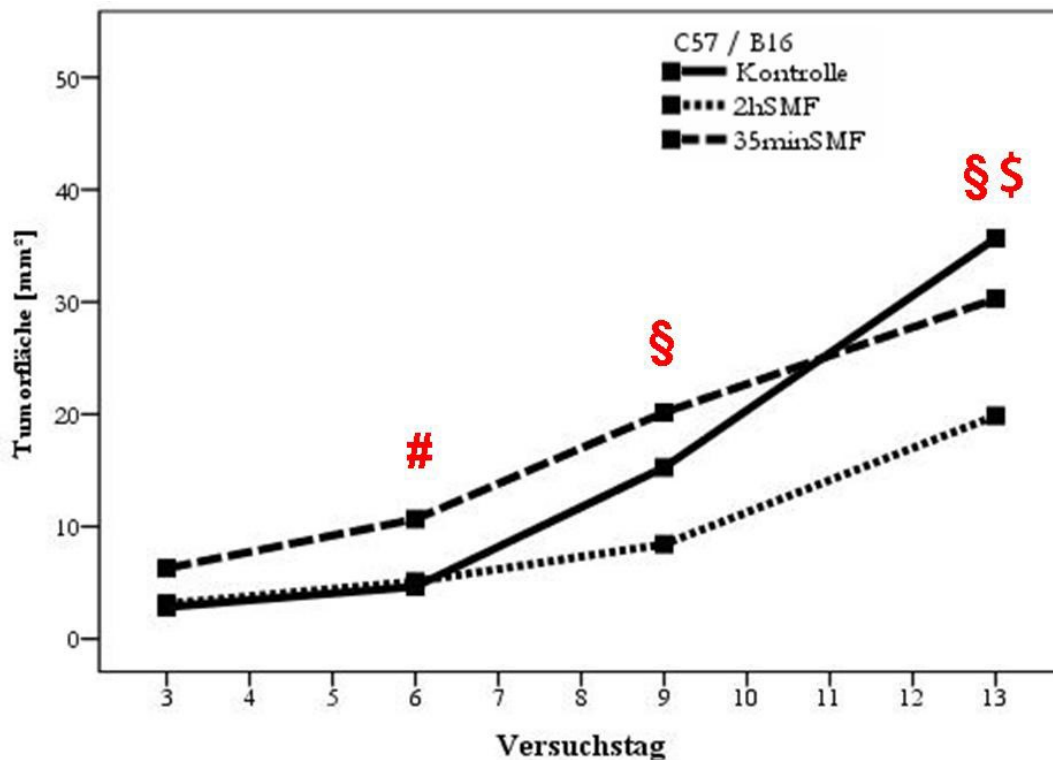


Abbildung 10: Tumorfläche (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF; n=6): Median als Messpunkt.

An Tag 6 war die mediane Tumorgröße der Kontrollgruppe signifikant kleiner als die unter der fraktionierten Magnetfeldtherapie (# $p < 0,05$ Kontrolle vs. 35minSMF). Ab Tag 9 wiesen die Tumoren unter der unfraktionierten Magnetfeldexposition signifikant kleinere Flächen auf als die unter der fraktionierten Magnetfeldexposition (§ $p < 0,05$ 2hSMF vs. 35minSMF) und an Tag 13 auch als die der Kontrollgruppe (§ $p < 0,05$ 2hSMF vs. Kontrolle).

4.2.2. Mikrohämodynamik

Die Analyse der Mikrozirkulation erfolgte intravitalmikroskopisch nach intravenöser Applikation des Plasmamarkers FITC-Dextran an den Tagen 7 und 13 nach Tumorinokulation. In allen Gruppen zeigte sich eine für Tumore typische chaotische Gefäßarchitektur mit Kalibersprüngen, Gefäßschleifen und zahlreichen Anastomosen.

4.2.2.1. Erythrozytenfließgeschwindigkeit v_{RBC} [mm/s]

Die mediane Erythrozytenfließgeschwindigkeit nahm in allen drei Versuchsgruppen über den Versuchszeitraum hinweg tendenziell zu, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Auch zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. (Abb. 11).

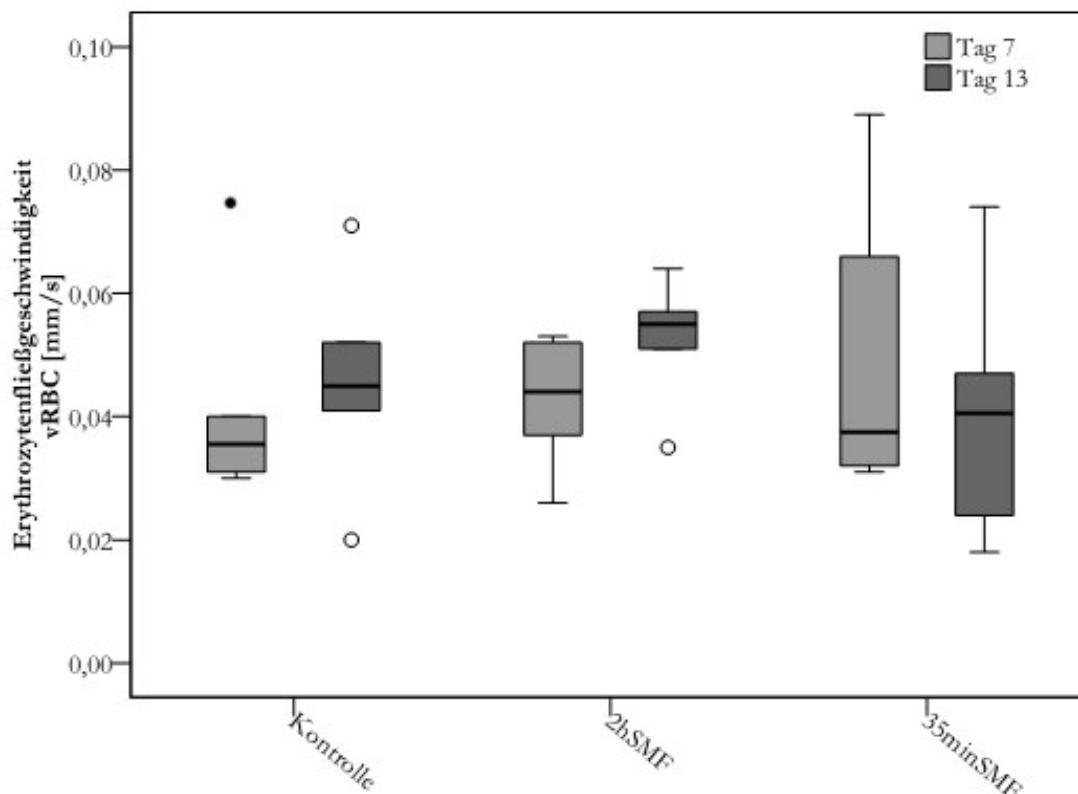


Abbildung 11: Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF; n=6)

Die mediane Erythrozytenfließgeschwindigkeit nahm in allen drei Versuchsgruppen tendenziell zu. Statistische Signifikanz wurde hierbei nicht erreicht.

4.2.2.2. Gefäßdurchmesser d [μm]

Innerhalb der drei Versuchsgruppen blieb der Gefäßdurchmesser von Tag 7 bis Tag 13 weitgehend konstant. Allerdings wiesen die Tumore unter fraktionierter Magnetfeldexposition durchgehend größere Gefäßdurchmesser auf als die Tumore der anderen beiden Versuchsgruppen; an Tag 7 erreichte diese Differenz sogar statistische Signifikanz zur Kontrolle ($11,7 \pm 1,3 \mu\text{m}$ bei 35minSMF vs. $9,6 \pm 1,5 \mu\text{m}$ in den Kontrollen); siehe Abb. 12.

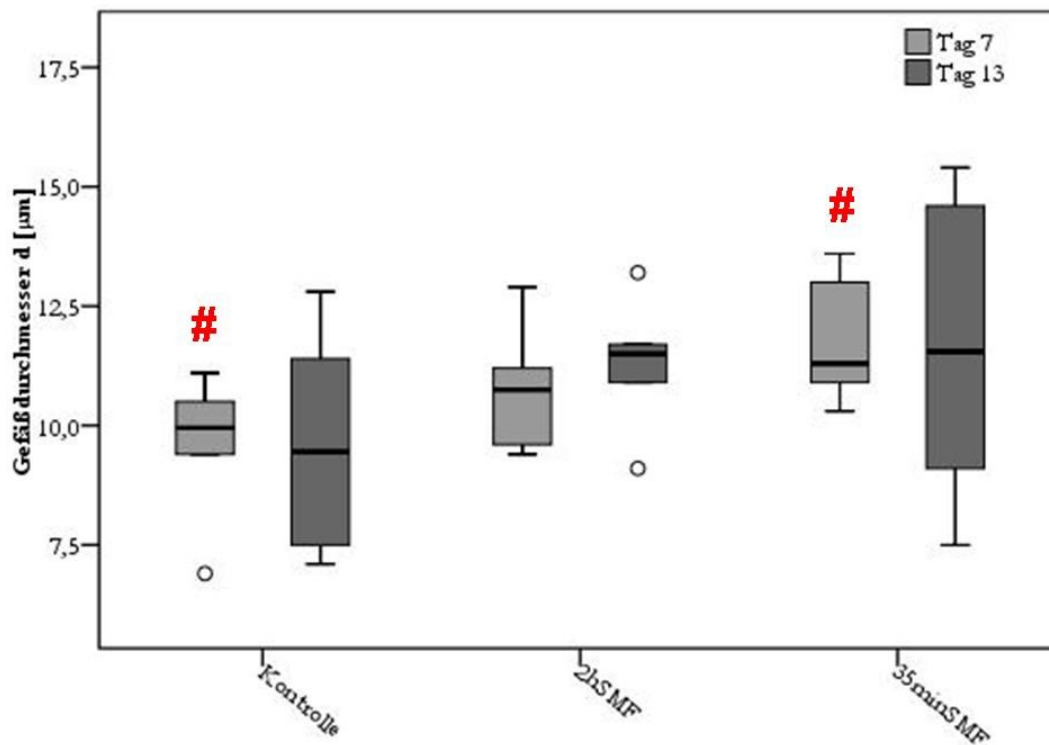


Abbildung 12: Gefäßdurchmesser der Tumorblutgefäße (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF; n=6)

Der Gefäßdurchmesser blieb innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen weitgehend konstant, allerdings in der Gruppe unter fraktionierter Magnetfeldexposition auf etwas höherem Niveau als in den anderen beiden Versuchsgruppen (# $p < 0,05$ Kontrolle vs. 35minSMF).

4.2.2.3. Funktionelle Gefäßdichte $fvd [mm^{-1}]$

Die funktionelle Gefäßdichte zeigte im Versuchsverlauf innerhalb der Kontrollgruppe und unter fraktionierter Magnetfeldexposition eine deutliche Zunahme. Unter unfraktionierter Magnetfeldexposition nahm die funktionelle Gefäßdichte jedoch leicht ab (Abb. 13).

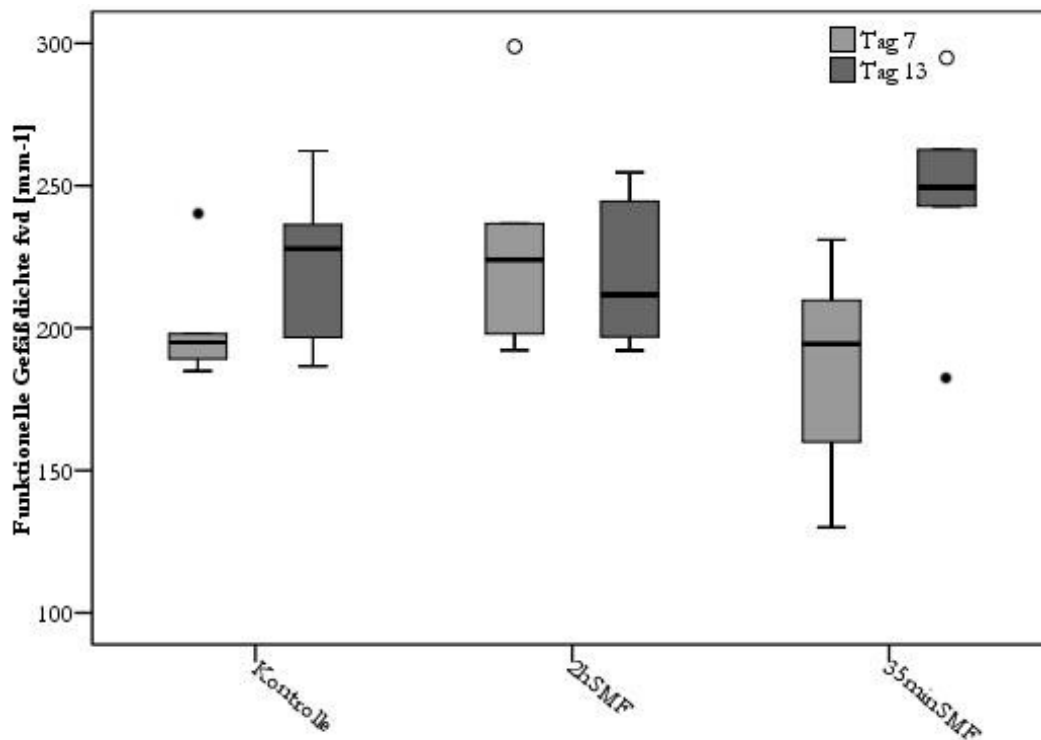


Abbildung 13: Funktionelle Gefäßdichte der Tumoren (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF; n=6)

Innerhalb der Kontrollgruppe und unter der fraktionierten Magnetfeldexposition nahm die funktionelle Gefäßdichte deutlich zu, unter unfraktionierter Magnetfeldexposition eher ab, wobei jedoch keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

4.2.3. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Nach intravenöser Applikation des Leukozytenmarkers Rhodamin 6G wurden an den Tagen 7 und 13 nach Tumorinokulation intravitalmikroskopisch die Parameter Leukozytenflux, Leukozytenrolling-Fraction und Leukozytenadhärenz erhoben.

4.2.3.1. Leukozytenflux [n/s]

An Tag 7 wurde unter der unfraktionierten Magnetfeldtherapie ein signifikant höherer Leukozytenflux gemessen als in der Kontrollgruppe ($3,1 \pm 0,6$ n/s bei 2hSMF vs. $2,2 \pm 0,5$ n/s in der Kontrolle) und tendenziell auch als unter der fraktionierten Magnetfeldtherapie; siehe Abb. 14.

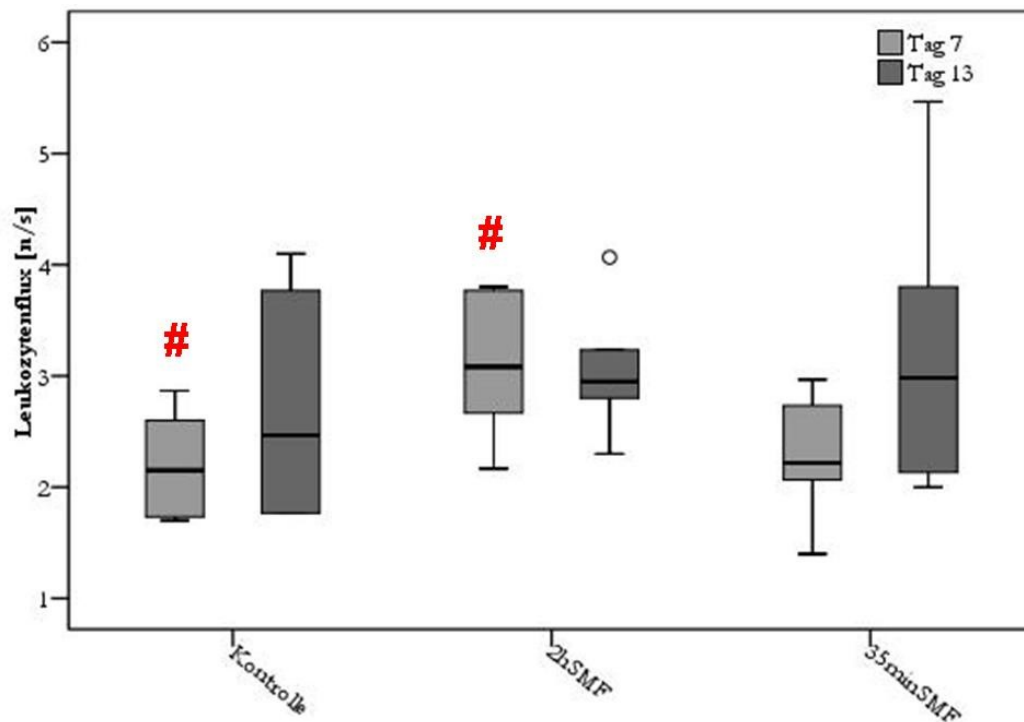


Abbildung 14: Leukozytenfluss in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF; n=6)

An Tag 7 war der Leukozytenfluss unter unfraktionierter Magnetfeldexposition signifikant höher als in den Kontrollen (# $p < 0,05$ 2hSMF vs. Kontrolle) und tendenziell auch als unter der fraktionierten Magnetfeldtherapie. Im weiteren Versuchsverlauf nivellierte sich dieser Effekt jedoch wieder.

4.2.3.2. *Leukozytenrolling-Fraction*

Die Leukozytenrolling-Fraction blieb in den beiden Gruppen unter Magnetfeldexposition zwischen Tag 7 und Tag 13 weitgehend konstant. In der Kontrollgruppe hingegen zeigte sich eine Abnahme ausgehend von einem höheren Wert an Tag 7. Signifikante Unterschiede konnten allerdings weder innerhalb einer einzelnen Versuchsgruppe noch zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 15).

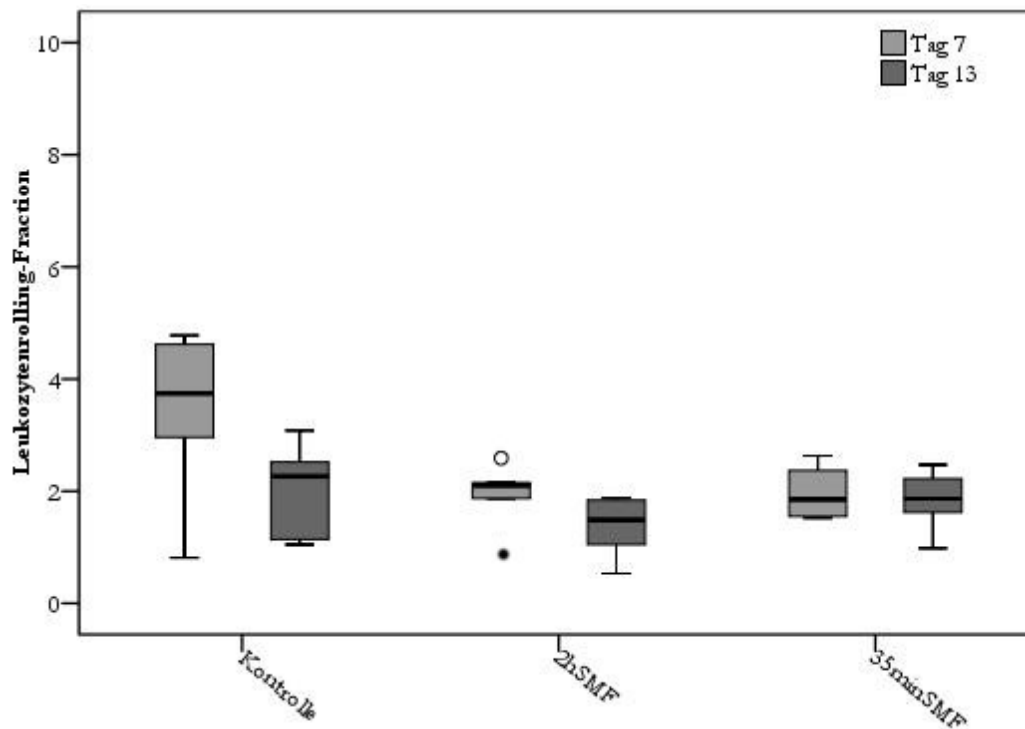


Abbildung 15: Leukozytenrolling-Fraction in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, 2hSMF und 35minSMF; n=6)

Die Gruppen unter Magnetfeldexposition zeigten zwischen den Messtagen eine weitgehend konstante Leukozytenrolling-Fraction, wohingegen in der Kontrolle ausgehend von einem höheren Wert an Tag 7 eine Abnahme zu verzeichnen war. Signifikanz innerhalb einer Gruppe oder zwischen den Gruppen wurde jedoch zu keinem Zeitpunkt erreicht.

4.2.3.3. *Leukozytenadhärenz [n/mm²]*

An Tag 7 zeigten sich unter der fraktionierten Magnetfeldexposition vermehrt adhärenente Leukozyten. Allerdings konnte innerhalb jeder einzelnen Versuchsgruppe und zwischen den drei Versuchsgruppen während des Versuchs keine signifikante Änderung bezüglich der Leukozytenadhärenz festgestellt werden (Abb. 16).

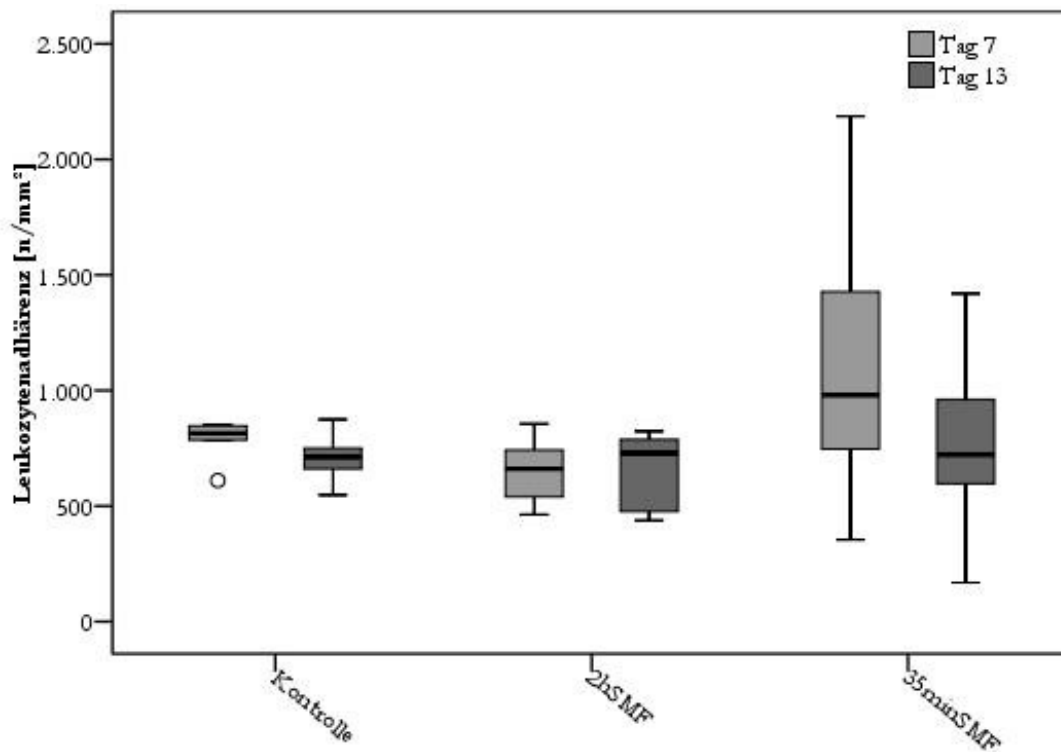


Abbildung 16: Leukozytenadhärenz in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF; n=6)

Allenfalls unter der fraktionierten Magnetfeldtherapie ließen sich vermehrt adhärenente Leukozyten messen. Signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch weder innerhalb noch zwischen den drei Versuchsgruppen.

4.3. Einfluss von Cetuximab als Monotherapie sowie in Kombination mit unfraktionierter und fraktionierter Magnetfeldexposition auf LLC-1-Tumore *in vivo*

Bisher ist nichts über die Wirksamkeit von Cetuximab auf LLC-1 Tumoren bekannt, sodass zunächst untersucht werden sollte, welchen Effekt Cetuximab auf das Wachstum und die Mikrozirkulation von LLC-1-Tumore hat.

Die in *in vitro*-Versuchen nachgewiesene Konformationsänderung des EGF-Rezeptors durch Magnetfeldexposition könnte die Bindungseigenschaft von Cetuximab bei LLC-1 beeinflussen, weshalb die Cetuximabgabe in einem zweiten Versuchsschritt mit Magnetfeldexposition kombiniert wurde.

Hierzu wurden das Tumorwachstum und mikrozirkulatorische Parameter unter Cetuximab-Monotherapie (Cetuximab; n=6) sowie unter Kombinationstherapien aus Cetuximab und unfraktionierter Magnetfeldexposition (2hSMF+Cetuximab; n=6) sowie Cetuximab und

fraktionierter Magnetfeldexposition (35minSMF+Cetuximab; n=6) untersucht und mit Kontrolltumoren ohne Therapie (Kontrolle; n=6) verglichen.

4.3.1. Tumorfläche [mm²]

Zu Therapiebeginn an Tag 3 wiesen die Gruppen vergleichbare Tumorgrößen von durchschnittlich $3,83 \pm 2,51 \text{ mm}^2$ auf. Zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten konnte in allen untersuchten Gruppen jeweils ein signifikantes Tumorwachstum nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich ab Tag 9: Die mit Cetuximab behandelten Tumore wuchsen am langsamsten (Cetuximab, Tag 9: $8,12 \pm 3,30 \text{ mm}^2$). Dieser Therapieeffekt unter Cetuximab-Monotherapie erfuhr bei Kombination mit Magnetfeldexposition eine Abschwächung: Tumore, die mit Cetuximab therapiert und dreimalig $0,587 \text{ T}$ für je zwei Stunden ausgesetzt wurden, wuchsen zwar signifikant langsamer als die Kontrolltumore (2hSMF+Cetuximab, Tag 13: $21,32 \pm 5,01 \text{ mm}^2$ vs. Kontrolle, Tag 13: $35,41 \pm 12,40 \text{ mm}^2$), aber schneller als Tumore unter Cetuximab-Monotherapie (Cetuximab, Tag 13: $16,72 \pm 4,57 \text{ mm}^2$). Wurde die Therapie mit Cetuximab kombiniert mit 35minütiger täglicher Magnetfeldexposition (35minSMFCetuximab, Tag 13: $32,46 \pm 7,10 \text{ mm}^2$), war das Tumorwachstum nur noch unsignifikant verlangsamt gegenüber unbehandelten Kontrolltumoren; siehe Abb. 17.

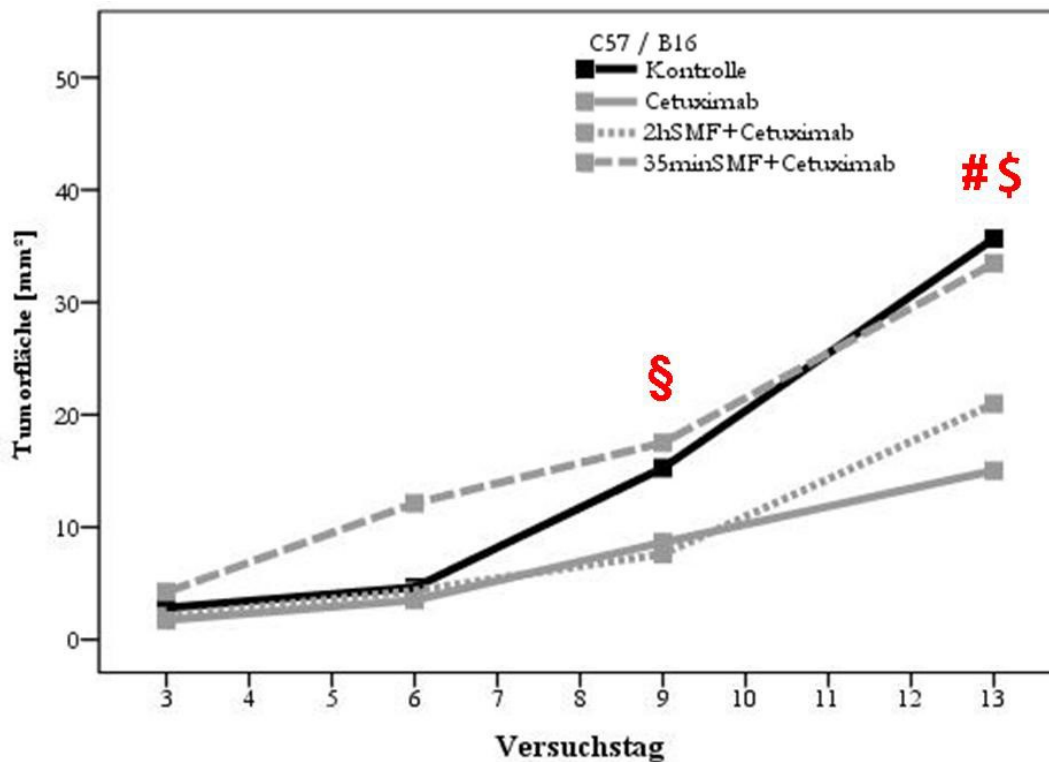


Abbildung 17: Tumorfläche (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab; n=6): Median als Messpunkt.

Alle drei Therapiegruppen zeigten eine reduzierte Wachstumstendenz gegenüber der untherapierten Kontrollgruppe (# $p < 0,05$ Cetuximab und 2hSMF+Cetuximab vs. Kontrolle). Am deutlichsten fiel der Effekt des verminderten Tumorwachstums hierbei unter alleiniger Cetuximabgabe aus, wobei die fraktionierte Magnetfeldexposition diesen deutlicher abschwächte als die unfraktionierte (§ $p < 0,05$ Cetuximab vs. 35minSMF+Cetuximab, Tag 9; § $p < 0,05$ Cetuximab und 2hSMF+Cetuximab vs. 35minSMF+Cetuximab, Tag 13).

Betrachtet man das Tumorwachstum vor dem Hintergrund der Frage, ob der tumorwachstumshemmende Effekt des Magnetfeldes durch die Cetuximabtherapie verändert wird, fällt auf, dass sich keine Veränderung durch die zusätzliche Medikamentengabe nachweisen lässt. Magnetfeld-exponierte Tumore wachsen langsamer als Kontrolltumore – unabhängig davon, ob Cetuximab verabreicht wird oder nicht (Abb. 18).

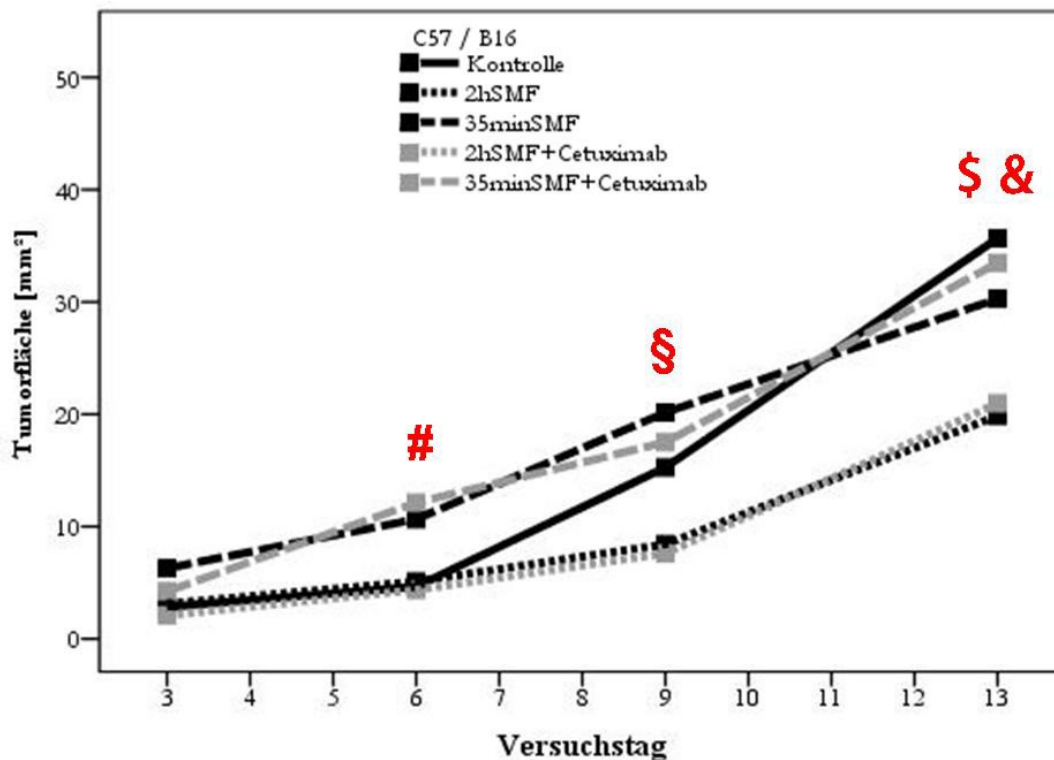


Abbildung 18: Tumorfläche (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab; n=6): Median als Messpunkt.

Durch die zusätzliche Cetuximabgabe wird der wachstumsinhibierende Effekt der Magnetfeldtherapie nicht wesentlich beeinflusst (# $p < 0,05$ Kontrolle und 2hSMF+Cetuximab vs. 35minSMF; § $p < 0,05$ 2hSMF und 2hSMF+Cetuximab vs. 35minSMF; \$ $p < 0,05$ 2hSMF vs. Kontrolle, 35minSMF und 35minSMF+Cetuximab; & $p < 0,05$ 2hSMF+Cetuximab vs. 35minSMF).

4.3.2. Mikrohämodynamik

4.3.2.1. Erythrozytenfließgeschwindigkeit v_{RBC} [mm/s]

In den Kontrolltumoren nahm die Erythrozytenfließgeschwindigkeit tendenziell zu, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. In den Tumoren, die mit Cetuximab als Monotherapie oder in Kombination mit unfraktionierter Magnetfeldexposition therapiert wurden, blieb die Erythrozytenfließgeschwindigkeit über den Versuchszeitraum weitgehend konstant. Lediglich bei Kombination der fraktionierten Magnetfeldtherapie mit Cetuximab zeigte sich eine signifikante Abnahme der Erythrozytenfließgeschwindigkeit ($0,06 \pm 0,01$ an Tag 7 vs. $0,05 \pm 0,01$ an Tag 13), allerdings bei stark erhöhtem Ausgangswert (Abb. 19).

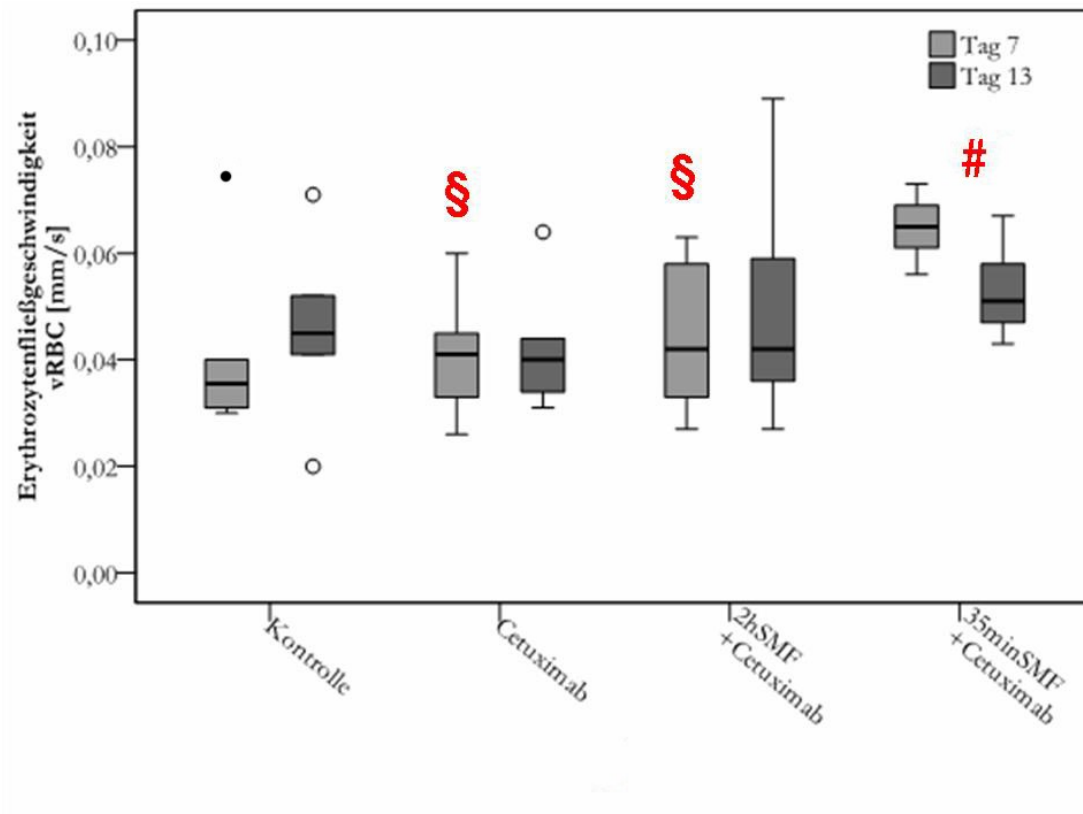


Abbildung 19: Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab; n=6).

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit nahm in Kontrolltumoren tendenziell zu; in Tumoren unter Cetuximabmonotherapie sowie kombiniert mit unfraktionierter Magnetfeldexposition blieb sie gleich. Nur unter der Kombination von Cetuximab und fraktionierter Magnetfeldexposition war eine signifikante Abnahme der Erythrozytenfließgeschwindigkeit nachweisbar (# $p < 0,05$ Tag7 vs. Tag 13), allerdings ausgehend von einem vergleichsweise sehr hohen Ausgangswert (§ $p < 0,05$ vs. 35minSMF+Cetuximab).

4.3.2.2. Gefäßdurchmesser d [μm]

Der Vergleich der Gefäßdurchmesser erbrachte innerhalb einer jeden Versuchsgruppe und zwischen den drei Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 20).

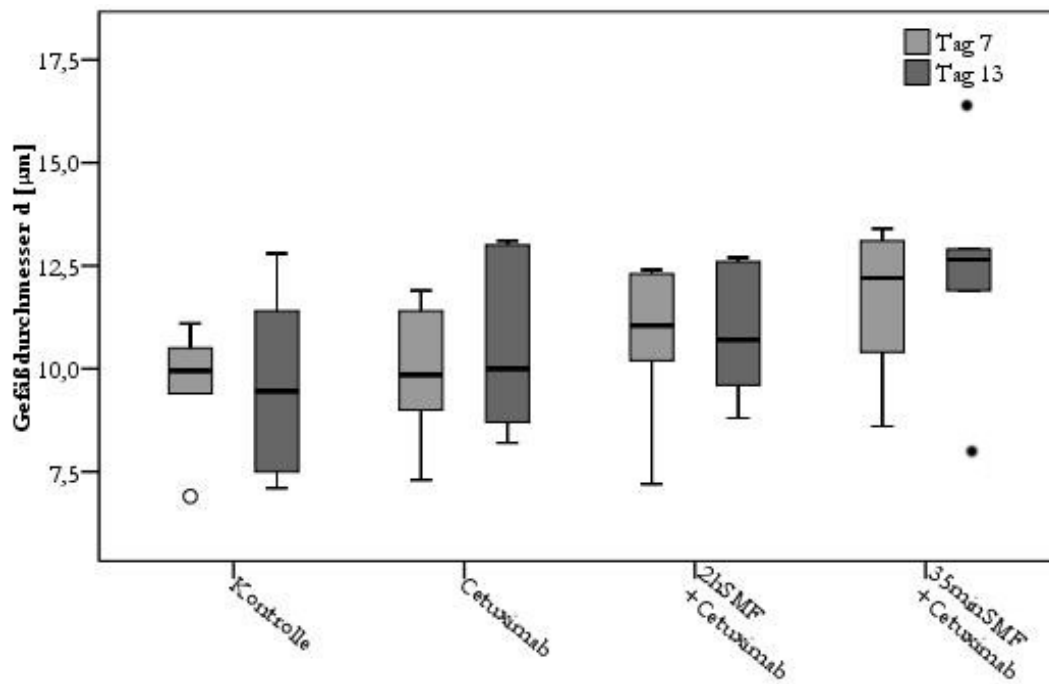


Abbildung 20: Gefäßdurchmesser der Tumorblutgefäße (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab; n=6)

Hinsichtlich der Gefäßdurchmesser zeigten sich innerhalb und zwischen den Gruppen vergleichbare Werte.

4.3.2.3. Funktionelle Gefäßdichte $fvd [mm^{-1}]$

Alle Versuchsgruppen einschließlich der Kontrolltumore zeigten eine Zunahme der funktionellen Gefäßdichte über den Versuch hinweg. Statistisch signifikante Veränderungen waren jedoch weder innerhalb der einzelnen Versuchsgruppe noch zwischen den Gruppen nachweisbar (Abb. 21).

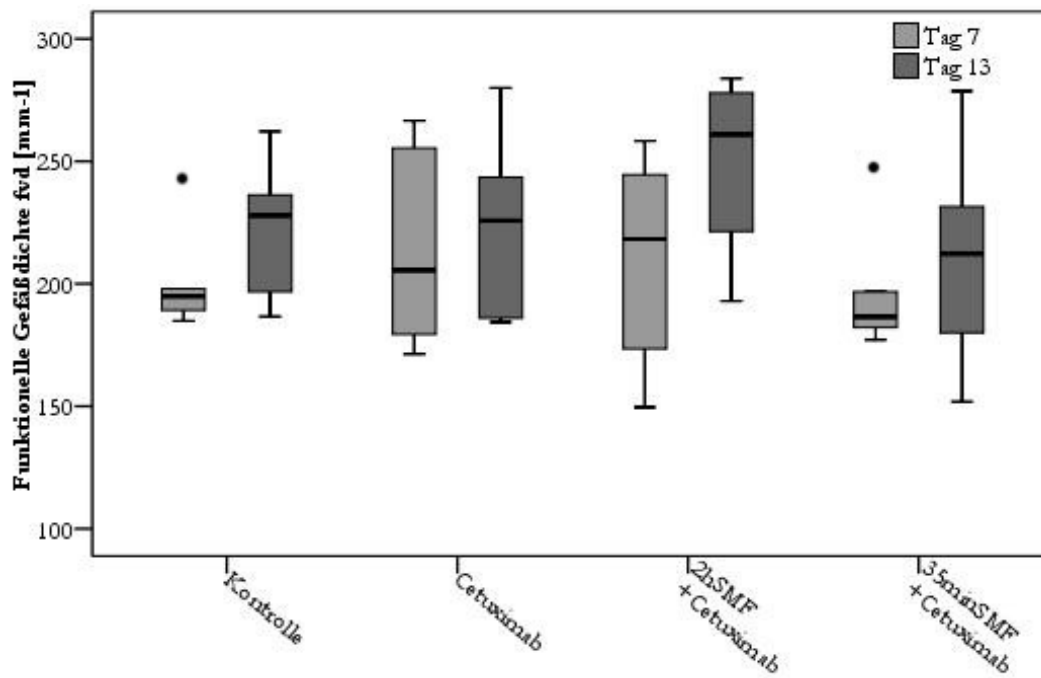


Abbildung 21: Funktionelle Gefäßdichte in den Tumoren (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab; n=6)

In allen 4 Gruppen zeigte sich eine Zunahme der funktionellen Gefäßdichte während des Versuches. Statistisch signifikante Unterschiede konnten jedoch weder innerhalb einer Versuchsgruppe noch zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen erkannt werden.

4.3.3. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

4.3.3.1. Leukozytenflux [n/s]

Der Leukozytenflux nahm in der Kontrollgruppe und unter den Kombinationstherapien leicht zu. In den Tumoren unter Cetuximab-Monotherapie war der Leukozytenflux annähernd konstant, sodass- verglichen mit der Gruppe der größten Zunahme, der Kombination aus Cetuximab und unfraktionierter Magnetfeldexposition – an Tag 13 statistische Signifikanz erreicht wurde ($2,2 \pm 0,3$ [n/s] unter Cetuximab vs. $3,5 \pm 0,7$ [n/s] unter 2hSMF+Cetuximab); siehe Abb. 22.

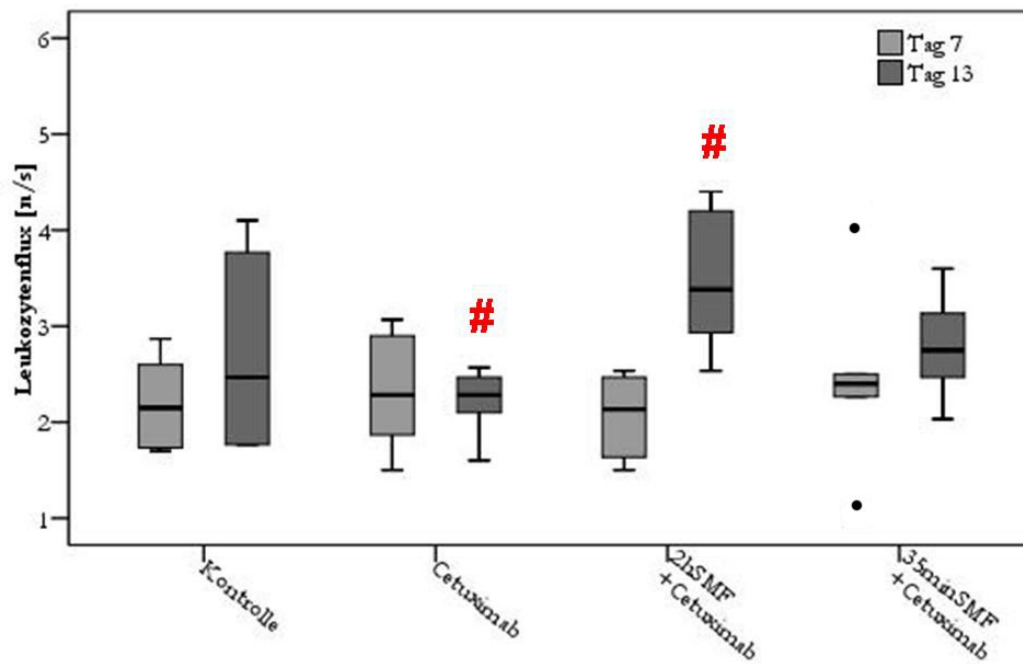


Abbildung 22: Leukozytenflux in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab; n=6)

Unter der Cetuximab-Monotherapie zeigten sich im Verlauf konstante Leukozytenflux-Werte, wogegen in den anderen drei Gruppen tendenziell eine Zunahme zu verzeichnen war. Hieraus ergaben sich an Tag 13 unter kombinierter unfraktionierter Magnetfeldexposition und Cetuximab-Therapie signifikant höhere Werte hinsichtlich des Leukozytenflux als unter der Cetuximab-Monotherapie (# $p < 0,05$ Cetuximab vs. 2hSMF+Cetuximab).

4.3.3.2. *Leukozytenrolling-Fraction*

In der Kontrollgruppe sowie unter den Kombinationstherapien aus Cetuximab und Magnetfeldexposition war die mediane Leukozytenrolling-Fraction eher regredient, wogegen sie unter der Cetuximab-Monotherapie geringfügig zunahm. Innerhalb jeder einzelnen Versuchsgruppe sowie zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen konnten im Versuchsverlauf dabei keine signifikanten Änderungen festgestellt werden (Abb. 23).

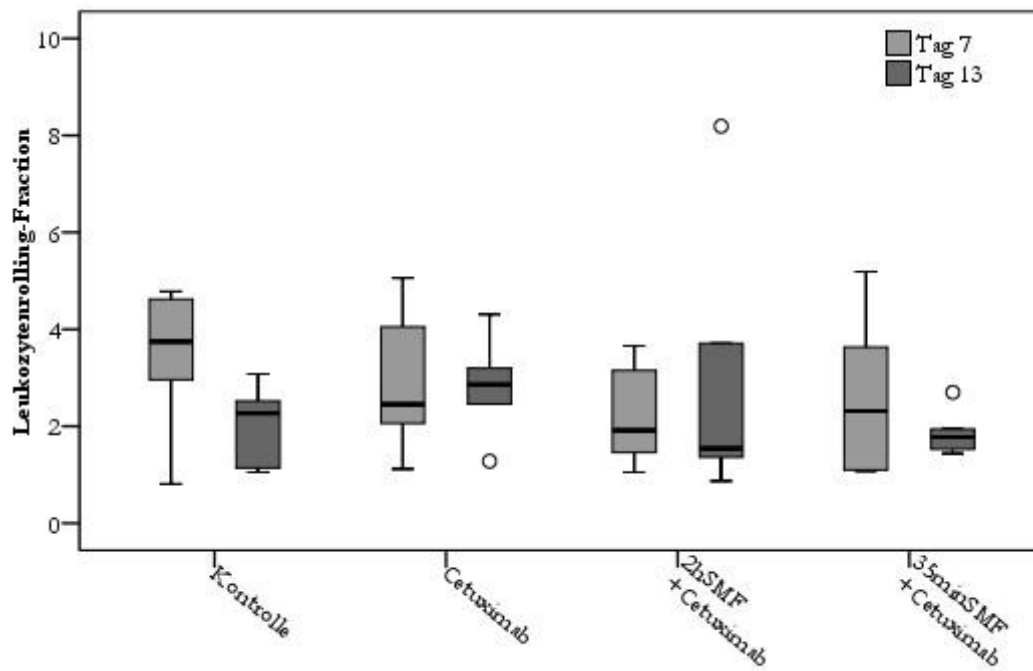


Abbildung 23: Leukozytenrolling-Fraction in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab; n=6)

Die mediane Leukozytenrolling-Fraction nahm unter der Cetuximabtherapie geringfügig zu, wohingegen sie in den anderen Gruppen eher abnahm. Signifikanz ergab sich für die Unterschiede innerhalb einer einzelnen Gruppe und zwischen den Gruppen indes nicht.

4.3.3.3. *Leukozytenadhärenz [n/mm²]*

Hinsichtlich der Leukozytenadhärenz ergaben sich innerhalb jeder einzelnen Versuchsgruppe und zwischen den Gruppen zu den Messzeitpunkten keine signifikanten Änderungen (Abb. 24).

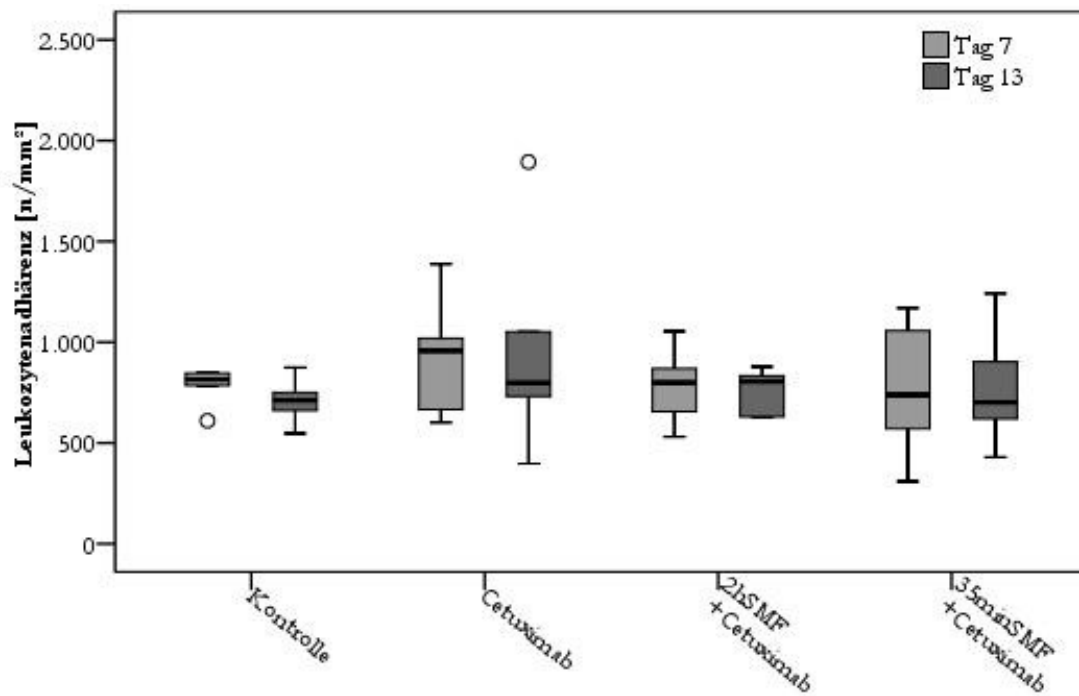


Abbildung 24: Leukozytenadhärenz in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab; n=6)

Die Leukozytenadhärenz zeigte innerhalb einer jeden Versuchsgruppe und zwischen den Versuchsgruppen im Verlauf weitestgehend konstante Werte.

4.4. Evaluierung möglicher immunologischer Reaktionen gegen Cetuximab im Mausmodell

Die Versuche an den immunsupprimierten Tieren dienten der Evaluation möglicher immunologischer Reaktionen gegen den chimären Antikörper Cetuximab in der Maus. In immunkompetenten Mäusen auftretende Effekte könnten somit auch unabhängig von der tatsächlichen Cetuximabwirkung durch physiologische immunologische Reaktionen gegen den humanen Antikörperanteil entstehen.

Es wurde die immunkompetente Kontrollgruppe (Kontrolle; n=6) gegen die immunsupprimierte Kontrollgruppe (KontrolleIS; n=6) sowie die immunkompetente Cetuximab-Gruppe (Cetuximab; n=6) gegen die immunsupprimierte Cetuximab-Gruppe (CetuximabIS; n=6) verglichen.

4.4.1. Tumorfläche [mm²]

Zu Versuchsbeginn zeigten alle Versuchstiere, unabhängig vom Immunstatus, vergleichbare Tumorgrößen von $3,08 \pm 1,51 \text{ mm}^2$.

Ab Tag 6 waren die Tumorflächen der immunsupprimierten Tiere stets größer als die der immunkompetenten. Im immunsupprimierten Modell waren bereits ab Tag 6 die Kontrolltumore signifikant größer als die mit Cetuximab therapierten Tumore. Im immunkompetenten Modell lag hierfür erst an Tag 13 Signifikanz vor. Abb. 25.

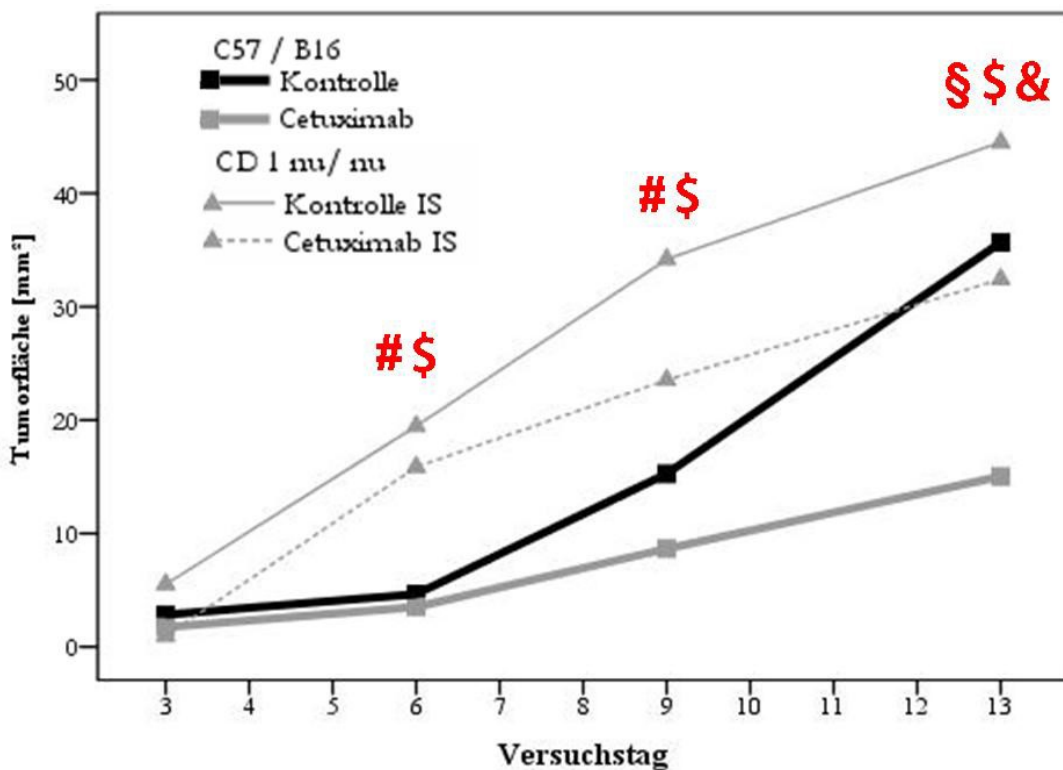


Abbildung 25: Tumorfläche (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS und CetuximabIS; n=6): Median als Messpunkt.

Ab Tag 6 waren die Tumoren im immunsupprimierten Mausmodell größer als im immunkompetenten Mausmodell (# $p < 0,05$ immunsupprimiert vs. immunkompetent; § $p < 0,05$ Cetuximab vs. CetuximabIS). Zudem wuchsen die Tumoren in beiden Mausmodellen unter der Cetuximab-Therapie langsamer als in den untherapierten Kontrollen, wobei die Unterschiede bei Immunsuppression bereits ab Tag 6 signifikant waren und bei Immunkompetenz erst an Tag 13 (§ $p < 0,05$ CetuximabIS vs. KontrolleIS; & $p < 0,05$ Cetuximab vs. Kontrolle).

4.4.2. Mikrohämodynamik

4.4.2.1. Erythrozytenfließgeschwindigkeit v_{RBC} [mm/s]

In den immunsupprimierten Mäusen nahm die Erythrozytenfließgeschwindigkeit in beiden Gruppen, sowohl in der Kontrolle als auch unter Cetuximabtherapie, signifikant zu (KontrolleIS: $0,04 \pm 0,0$ mm/s an Tag 7 vs. $0,04 \pm 0,0$ mm/s an Tag 13; CetuximabIS: $0,03 \pm 0,0$ mm/s an Tag 7 vs. $0,04 \pm 0,01$ mm/s an Tag 13). Unter immunkompetenten Bedingungen hingegen stieg die Fließgeschwindigkeit in den Tumorblutgefäßen nur in der Kontrollgruppe an, wobei hier keine Signifikanz vorlag; siehe Abb. 26.

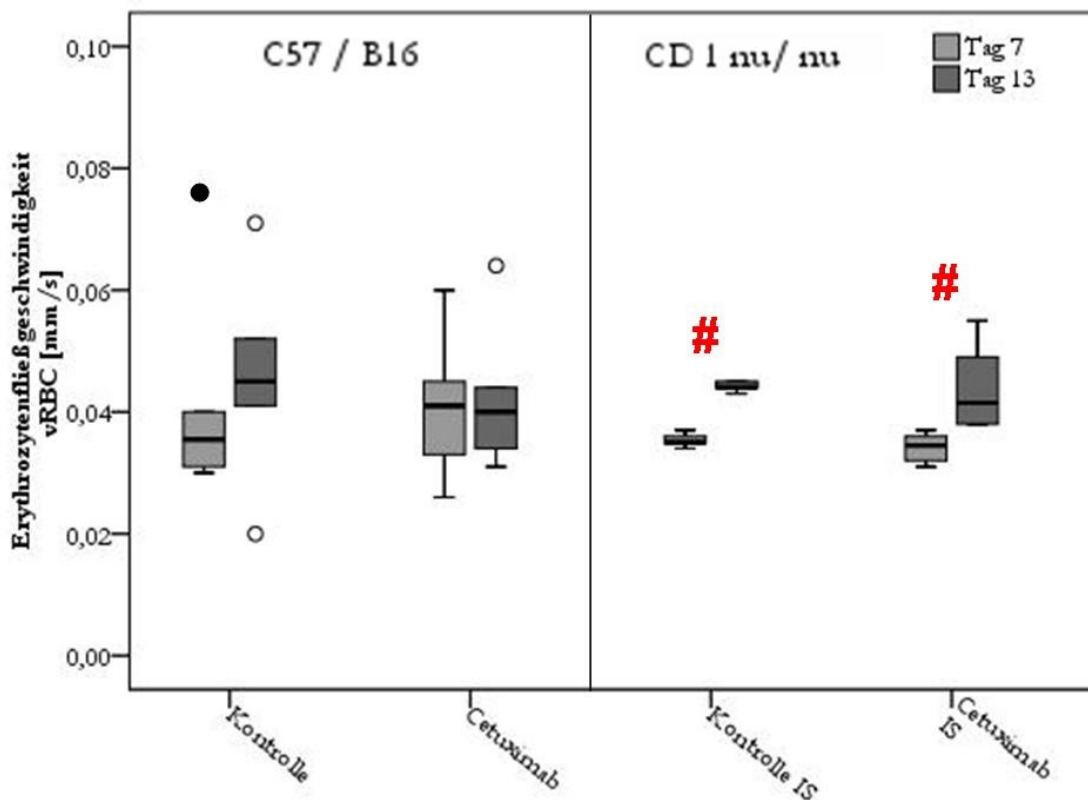


Abbildung 26: Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS; n=6)

Im immunsupprimierten Mausmodell nahm die Erythrozytenfließgeschwindigkeit sowohl unter der Cetuximab-Therapie als auch unter therapiefreien Bedingungen im Versuchsverlauf signifikant zu (# $p < 0,05$ Tag 7 vs. Tag 13). Bei den immunkompetenten Mäusen zeigte nur die Kontrollgruppe eine Zunahme der Fließgeschwindigkeit zwischen den Messtagen, wobei keine Signifikanz vorlag.

4.4.2.2. Gefäßdurchmesser d [μm]

Auch der Gefäßdurchmesser stieg im Versuchsverlauf in den immunsupprimierten Gruppen signifikant an (KontrolleIS: $10,6 \pm 0,6 \mu\text{m}$ an Tag 7 vs. $12,0 \pm 0,6 \mu\text{m}$ an Tag 13; CetuximabIS: $10,5 \pm 1,7 \mu\text{m}$ an Tag 7 vs. $12,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$ an Tag 13). Bei den immunkompetenten Gruppen blieben die Durchmesser der Gefäße hingegen konstant; siehe Abb. 27.

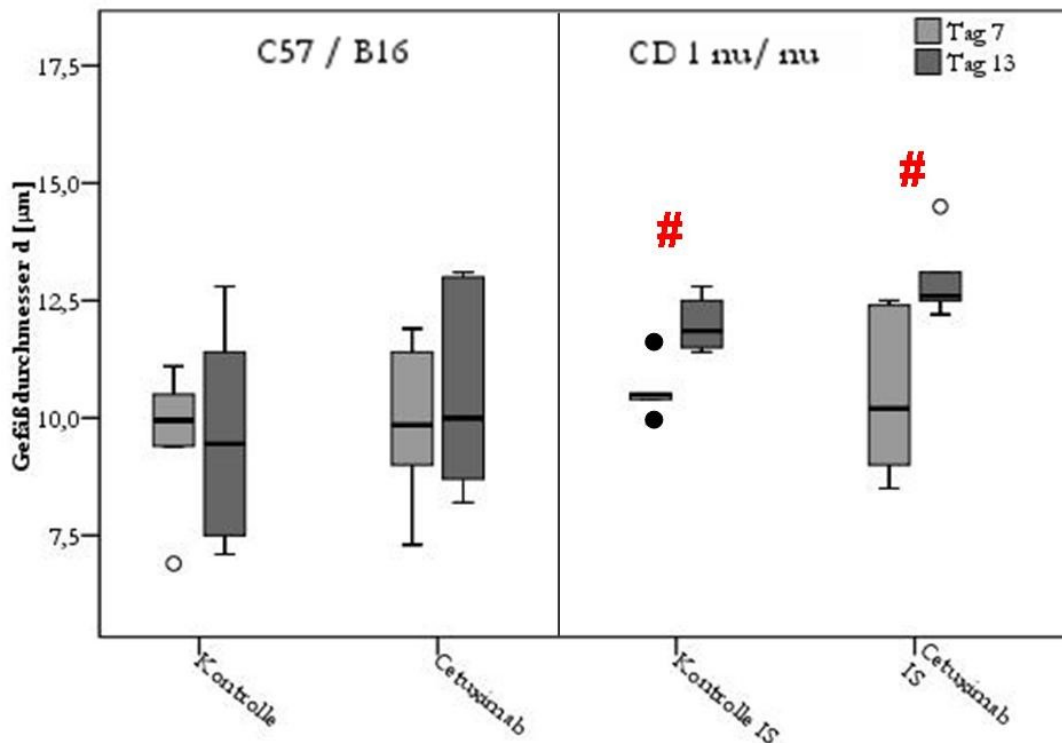


Abbildung 27: Gefäßdurchmesser der Tumorblutgefäße (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS; $n=6$)

Die Durchmesser der Tumorblutgefäße stiegen unter immunsupprimierten Bedingungen im Versuchsverlauf signifikant an ($\#p < 0,05$ Tag 7 vs. Tag 13), wohingegen sie unter immunkompetenten Bedingungen unverändert blieben.

4.4.2.3. Funktionelle Gefäßdichte fvd [mm^{-1}]

Unter Cetuximab-Therapie blieb die funktionelle Gefäßdichte im immunsupprimierten Tier konstant, in allen anderen Gruppen zeigte sich im Verlauf dagegen eine Zunahme. Für die immunsupprimierte Kontrollgruppe lag dabei sogar statistische Signifikanz vor (KontrolleIS: $190,05 \pm 7,96 \text{mm}^{-1}$ an Tag 7 vs. $224,65 \pm 7,05 \text{mm}^{-1}$ an Tag 13); siehe Abb. 28.

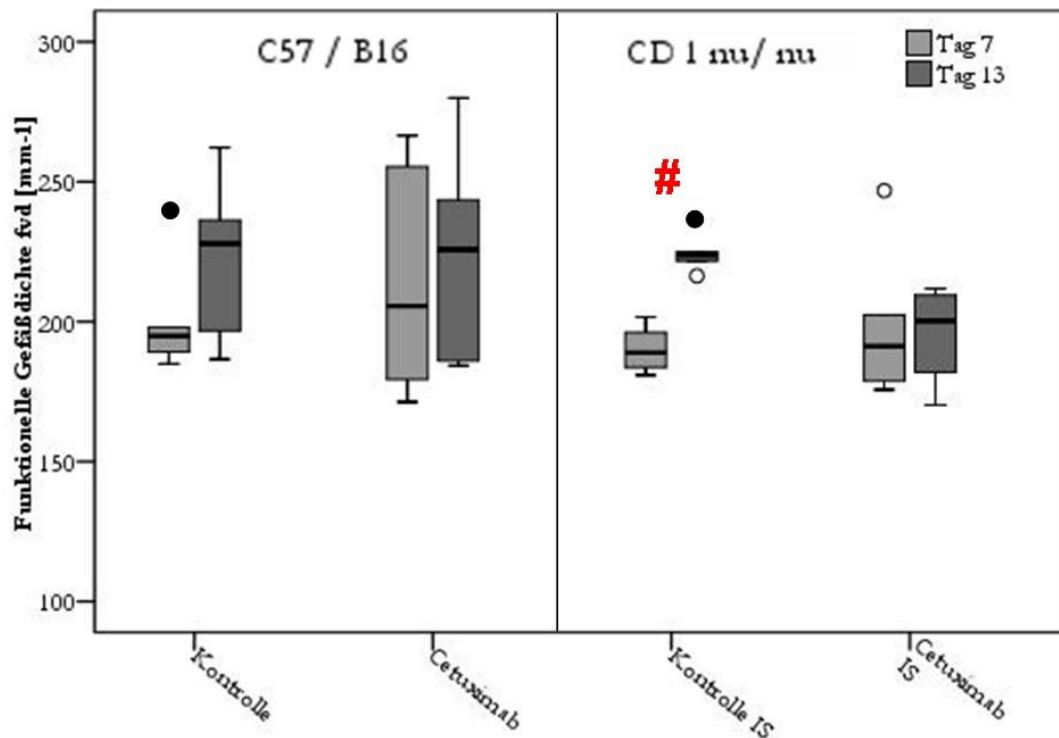


Abbildung 28: Funktionelle Gefäßdichte der Tumoren (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS; n=6)

Während die funktionelle Gefäßdichte unter der Cetuximab-Therapie im immunsupprimierten Mausmodell an beiden Untersuchungstagen vergleichbare Werte aufwies, zeigten die Tumoren der immunkompetent Cetuximab-Gruppe sowie der beide Kontrollgruppen eine Zunahme des Wertes im Verlauf. Für die immunsupprimierte Kontrollgruppe wurde hierbei Signifikanz erreicht (# $p < 0,05$ Tag 7 vs. Tag 13).

4.4.3. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

4.4.3.1. Leukozytenflux [n/s]

Während unter der Cetuximab-Therapie im immunkompetenten Tier an beiden Messtagen vergleichbare Leukozytenflux-Werte vorlagen, stiegen diese in beiden immunsupprimierten Gruppen signifikant und in der immunkompetenten Kontrollgruppe tendenziell zwischen Tag 7 und Tag 13 an (KontrolleIS: $2,4 \pm 0,1$ n/s an Tag 7 vs. $2,8 \pm 0,1$ n/s an Tag 13; CetuximabIS: $2,2 \pm 0,3$ n/s an Tag 7 vs. $2,7 \pm 0,3$ n/s an Tag 13). Abb. 29.

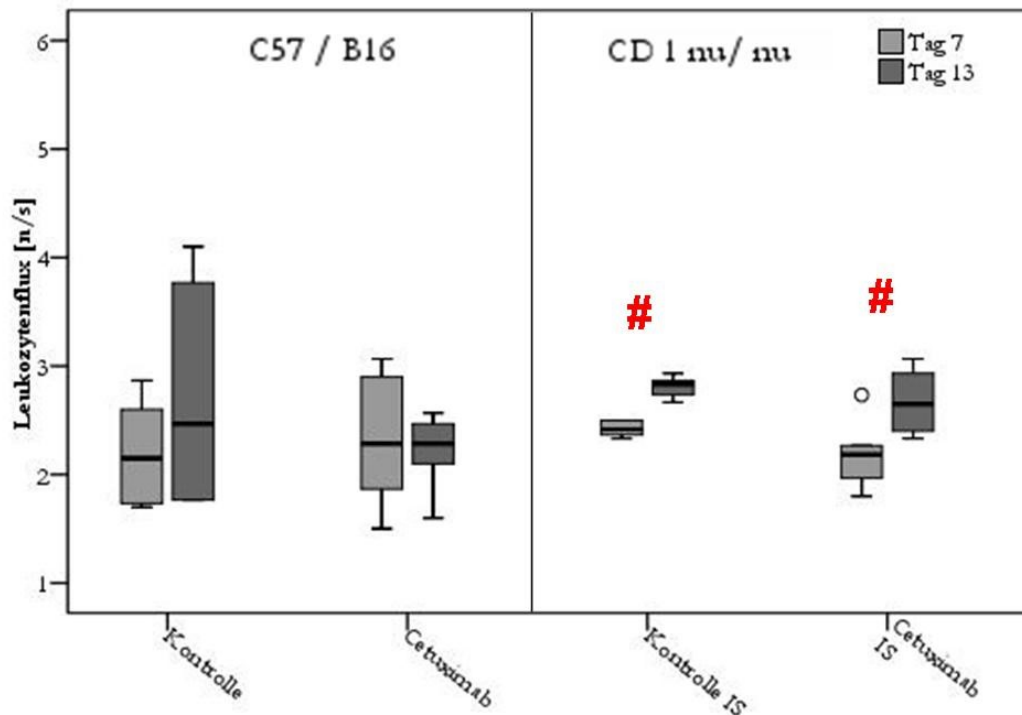


Abbildung 29: Leukozytenflux in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS; n=6)

Im immunsupprimierten Mausmodell war sowohl unter Cetuximab-Therapie als auch in der untherapierten Kontrollgruppe der Leukozytenflux im Versuchsverlauf signifikant zunehmend ($\#p < 0,05$ Tag 7 vs. Tag 13). Bei den immunkompetenten Mäusen nahm der Leukozytenflux in der Kontrollgruppe ebenfalls, wenn auch nicht signifikant, zu, wohingegen unter Cetuximab-Therapie an beiden Tagen vergleichbare Werte zu verzeichnen waren.

4.4.3.2. Leukozytenrolling-Fraction

Die Leukozytenrolling-Fraction nahm im immunsupprimierten Modell unter Cetuximabgabe signifikant ab ($1,90 \pm 0,68$ an Tag 7 vs. $0,95 \pm 0,32$ an Tag 13). Der am zweiten Versuchszeitpunkt gemessene Wert war somit signifikant niedriger als zum gleichen Zeitpunkt in der immunsupprimierten Kontrollgruppe (KontrolleIS: $2,16 \pm 0,7$) und in der immunkompetenten Cetuximabgruppe (Cetuximab: $2,83 \pm 0,99$); siehe Abb. 30.

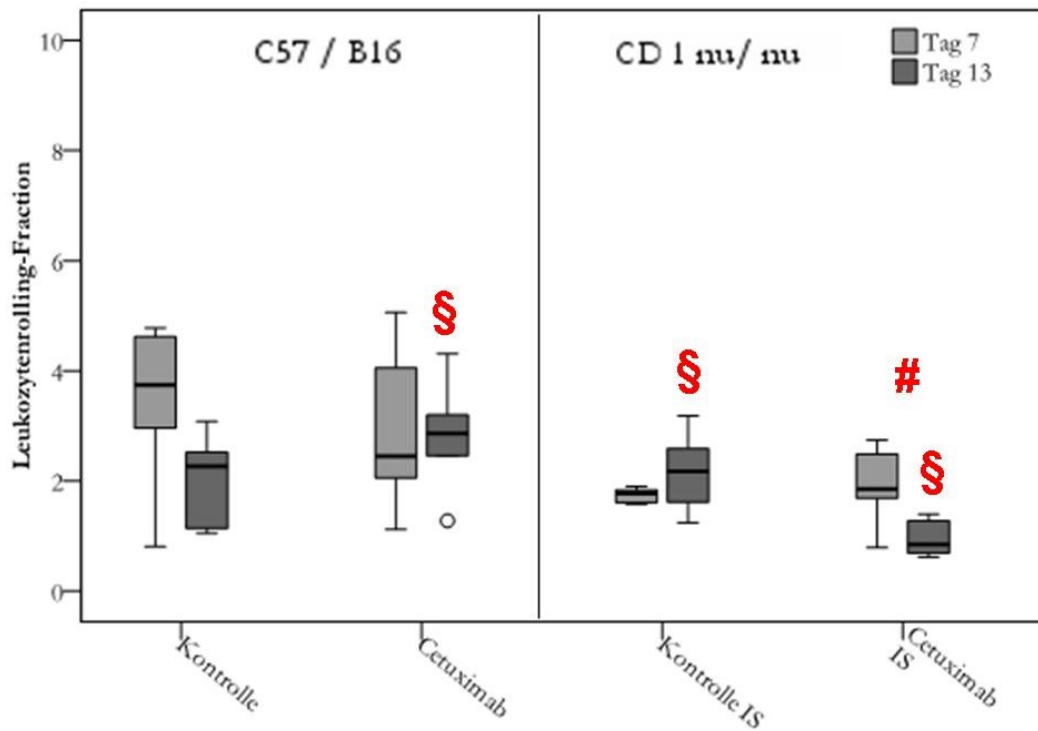


Abbildung 30: Leukozytenrolling- Fraction in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS; n=6)

In der Cetuximabgruppe der immunsupprimierten Mäuse nahm die Leukozytenrolling-Fraction signifikant ab (#p< 0,05 Tag 7 vs. Tag 13), sodass hier bei Versuchende im Vergleich zu den anderen Gruppen niedrigere Werte vorlagen (§p< 0,05 CetuximabIS vs. KontrolleIS und Cetuximab).

4.4.3.3. Leukozytenadhärenz [n/mm^2]

Im Versuchsverlauf nahm die Leukozytenadhärenz in der Kontrollgruppe unter immunsupprimierten Bedingungen signifikant ab ($932,57 \pm 90,06 \text{ n/mm}^2$ an Tag 7 vs. $765,83 \pm 49,79 \text{ n/mm}^2$ an Tag 13) und erreichte dabei gegen Versuchende einen signifikant niedrigeren Wert als in den immunsupprimierten Tieren unter Cetuximabtherapie (CetuximabIS: $932,57 \pm 90,06 \text{ n/mm}^2$). (Abb. 31).

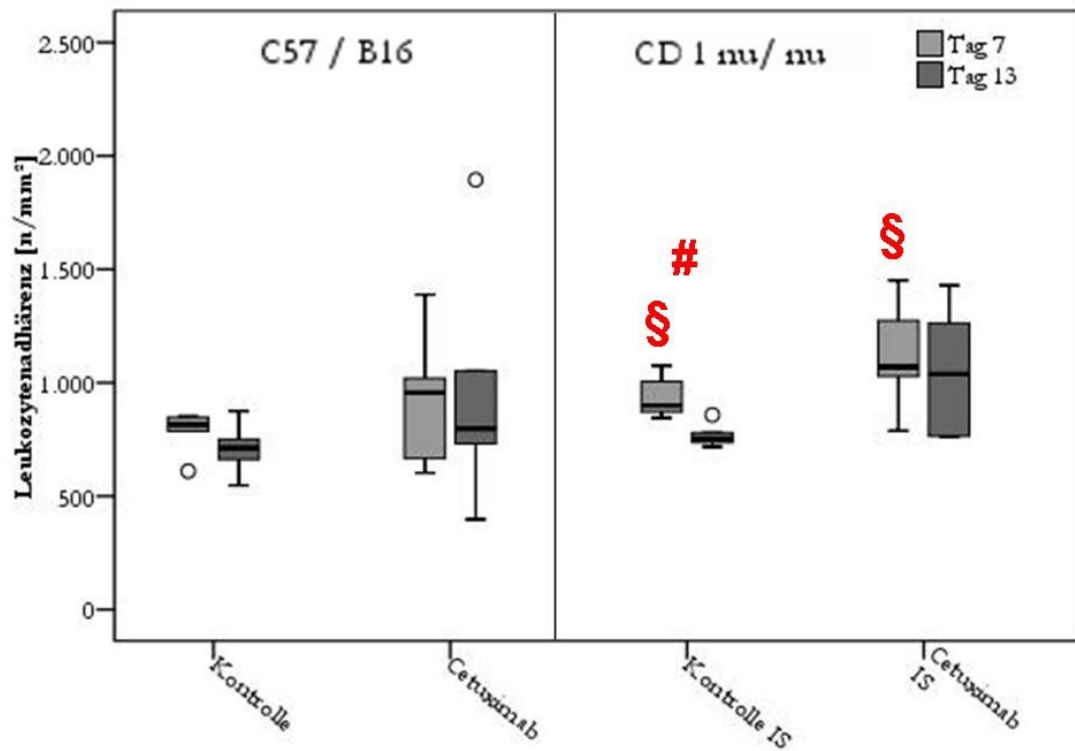


Abbildung 31: Leukozytenadhärenz in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS; n=6)

In den Tumorblutgefäßen der immunsupprimierten Kontrolle nahm die Anzahl der adhärenenten Leukozyten signifikant ab ($\#p < 0,05$ Tag 7 vs. Tag 13) und war somit am zweiten Messtag signifikant geringer als bei der immunsupprimierten Cetuximabgruppe ($\S p < 0,05$ KontrolleIS vs. CetuximabIS). Bei den immunkompetenten Mäusen ergaben sich hingegen innerhalb und zwischen beiden Gruppen konstante Zahlen.

5. DISKUSSION

5.1. Diskussion der Methodik

5.1.1. Das Rückenhautkammermodell

In der vorliegenden Arbeit sollten neue Ansätze zur Therapie von Plattenepithelkarzinomen untersucht werden. Neben einer Untersuchung der absoluten Tumorgröße sollten auch Veränderungen in der Mikrozirkulation des Tumorgewebes analysiert werden, zumal die Tumorangiogenese für das Wachstum und die Metastatisierung von Malignomen eine entscheidende Rolle spielen [99, 100] und daher einen zentralen Ansatzpunkt zahlreicher bereits etablierter Tumorthapien darstellt.

Der komplexe Vorgang der Angiogenese lässt sich *in vitro* nicht zufriedenstellend simulieren und analysieren [101], sodass ein geeignetes *in vivo*-Modell verwendet werden sollte. Hierfür stehen im Wesentlichen zwei Verfahren zur Verfügung, die Diaphanoskopie und die Epiillumination.

Mittels Diaphanoskopie kann die Hämodynamik von Geweben bis 300 µm Schichtdicke untersucht werden. Hierfür eignen sich beispielsweise das Mesenterium [102, 103], das Omentum der Katze [104], der Cremaster der Ratte [105] oder die Backentasche des Hamsters [106]. Diese Modelle erlauben jedoch nur eine einmalige Untersuchung für einige Stunden, zudem setzen sie ein frisches chirurgisches Trauma voraus, welches die Ergebnisse hätte verfälschen können. Darüber hinaus ist hierbei während der Untersuchung eine Injektions- oder auch Inhalationsnarkose notwendig, deren Einflüsse auf die Mikrozirkulation und den Metabolismus von Tumorgeweben nicht endgültig geklärt sind [107-112].

Die Epiillumination unter Verwendung fluoreszierender Marker ermöglicht auch die Untersuchung solider Organe [113, 114] und dank der Weiterentwicklung auf dem Feld der Intravitalmikroskopie inzwischen beinahe jeden Gewebes bezüglich seiner individuellen mikrozirkulatorischen Hämodynamik.

So kann beispielsweise eine wiederholte intravitalmikroskopische Untersuchung der Mikrozirkulation am Ohr der haarlosen Maus erfolgen, ohne dass hierfür ein chirurgisches Trauma oder eine Narkose notwendig wären. Allerdings lassen sich hier keine Tumoren oder andere Fremdmaterialien implantieren [115, 116].

Das Modell der transparenten Kaninchenohrkammer erlaubt die Implantation von Fremdgewebe. Im Rahmen der Wundheilung entsteht jedoch viel Granulationsgewebe mit reichlich Neovaskularisierung unabhängig vom implantierten Tumor. Zudem ist die Auswahl an Tumorzelllinien im Kaninchenohr geringer als im Mausmodell [117, 118].

Das Modell der transparenten Rückenhautkammer bietet die Möglichkeit, unkompliziert verschiedenr syngene und allogene Gewebe wie Fettgewebe [119], Ovarialgewebe [120], Langerhans-Zellen [121], poröses Polyethylen [122], synthetische Knochentransplantate [123] und solide Tumore [124-126] zu implantieren. Anschließend kann über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen eine kontinuierliche Beurteilung der Mikrozirkulation erfolgen, ohne dass hierfür ein erneutes Trauma oder anästhesierende Maßnahmen notwendig werden [127, 128]. Die aus Titan gefertigten Kammern weisen ein geringes Gewicht bei hoher Stabilität auf und sind weitestgehend inert, sodass die Tiere hierdurch kaum belastet werden [129]. Unter Berücksichtigung der von Sewell 1966 formulierten Kriterien für die Kammerpräparation kann von einer repräsentativen und intakten Tumorperfusion ausgegangen werden [80, 129, 130].

Zur Bearbeitung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellungen eignet sich das Rückenhautkammermodell aufgrund der genannten Vorteile hervorragend. Es ermöglicht die wiederholte Untersuchung der Tumormikrozirkulation und der Leukozyten-Endothelzellinteraktion *in vivo*, ohne diese wesentlich zu beeinflussen. Zudem kann auch die absolute Tumorgröße problemlos gemessen werden, da die Tumore in den Kammern in den ersten zwei Wochen nach Tumorzellinokulation flächig und somit weitgehend zweidimensional wachsen.

5.1.2. Das Lewis Lung Karzinom (LLC-1)

Die Tumorzelllinie des Lewig Lung Karzinoms verfügt über eine hohe Anwachsrate von 95% und weist ein schnelles Wachstum bei einer Regressionsrate von lediglich 4% auf [131]. In der Literatur wird für das LLC-1 eine hohe Malignität mit einer frühen Metastasierungstendenz beschrieben [131, 132]. Vorversuche zeigten eine EGFR-Expression von 90% im FACS. Somit werden wesentliche Kriterien, wie sie für Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs beschrieben sind, erfüllt.

Zudem ist das Tumormodell in der transparenten Rückenhautkammer bereits etabliert und die Zellen werden am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin in Kultur gehalten. Alternativ wäre die Verwendung einer humanen Plattenepithelkarzinomzelllinie, wie

beispielsweise FaDu-Zellen, möglich gewesen. Es gibt zahlreiche Studien, im Rahmen derer Cetuximab an FaDu-Zellen untersucht wurde [133-136]. Die Verwendung humaner Zellen hätte allerdings vorausgesetzt, dass alle Versuche an immundefizienten Tieren erfolgt wären, eine nicht optimale Voraussetzung für die Testung einer Immuntherapie.

5.1.3. Das statische Magnetfeld

Zur Durchführung der Magnetfeldexpositions-Studien sollten statische Magnetfelder hoher Flussdichte verwendet werden, da in einer früheren Studie eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Flussdichte und Störung der Mikrozirkulation nachgewiesen wurde [43] und somit bei höherer Flussdichte ein größerer Therapieeffekt zu erwarten war. Magnetfelder der angestrebten Größenordnung von ungefähr einem Tesla finden sich primär bei Magnet-Resonanz-Tomographen (MRT), welche allerdings sehr laut sind und vermutlich zu einer großen Belastung für die geräuschempfindlichen Mäuse geführt hätten. Durch das Anbringen magnetischer Teile an die Kammer selbst wäre eine vergleichbare magnetische Flussdichte jedoch nicht erreichbar. Zudem würden die Tiere durch das zusätzliche Gewicht behindert. Zur Generierung des statischen Magnetfeldes wurde daher ein NeFeB-Stabmagnet verwendet. Hierbei handelt es sich um ein von von Brix *et al.* etabliertes Verfahren [43], welches eine Flussdichte von bis zu 0,587 T erzeugt. Da die Flussdichte innerhalb des gesamten Beobachtungsareals der Rückenhautkammer weitgehend homogen ist, konnte zudem sichergestellt werden, dass eine gleichmäßige Magnetfeldexposition des gesamten Tumors stattfand. Für den Zeitraum der Exposition mussten die Tiere zwar immobilisiert werden. Allerdings fanden die Versuchsreihen tagsüber statt, sodass die nachtaktiven Mäuse währenddessen rasch wieder einschliefen.

5.1.4. Der EGFR-Antikörper Cetuximab

Der EGFR-Antikörper Cetuximab wurde zur Therapie humaner Tumoren entwickelt und bindet somit in erster Linie an humane EGF-Rezeptoren und mit geringerer Affinität auch an diejenigen von Primaten. Allerdings konnte vereinzelt auch eine Bindung an EGF-Rezeptoren anderer Spezies, wie beispielsweise des Kaninchens, nachgewiesen werden. Zudem fällt die Bindung offensichtlich auch abhängig vom untersuchten Gewebe und dem Geschlecht unterschiedlich aus [77]. Eine Untersuchung der Bindung beim LLC-1 wurde bisher nicht untersucht. Da Lungenkarzinome eine hohe Mutationsrate aufweisen [137] und kein muriner therapeutischer

EGFR-Antikörper für die Versuche zur Verfügung stand, sollte im Bewusstsein einer möglicherweise fehlenden Wirkung ein Therapieversuch mittel Cetuximab erfolgen.

5.1.5. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Visualisierung und quantitative Analyse der Mikrozirkulation und der Leukozyten-Endothelzellinteraktion im Tumor erfolgte mittels Intravitalmikroskopie nach Fluoreszenzmarkierung des Blutplasmas beziehungsweise der Leukozyten.

Dank der gut entwickelten digitalen Technologie und der hochauflösenden Systeme stellt die Intravitalmikroskopie seit Jahren den Goldstandard zur Beurteilung der Mikrozirkulation im Tumorgewebe dar [138]. Es ist eine kontinuierliche Beobachtung der Gefäßstruktur bei hoher Auflösung und guter optischer Abbildungsqualität möglich. Histologische Analysen bieten zwar ebenfalls eine gute Auflösung und Abbildungsqualität, allerdings kann das Gewebe nur zu einem Zeitpunkt untersucht werden, sodass sie dem dynamischen Prozess der Mikrozirkulation nicht ausreichend gerecht werden. Bei der Anfertigung der Präparate kann es zudem zu Gefäßveränderungen kommen, welche die Ergebnisse möglicherweise beeinflussen [139, 140].

Mittels verschiedener Fluoreszenzmarker können korpuskuläre Blutbestandteile visualisiert und Zell-Zell- oder Zell-Endothelinteraktionen quantifiziert werden. Somit ist neben der Erfassung der morphologischen Gefäßarchitektur auch die nichtinvasive Analyse mikrohämodynamischer Prozesse *in vivo* möglich [138, 141]. Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen in der Intravitalmikroskopie kann jedoch zur Phototoxizität und somit zu einer Störung der Funktion der Blutzellen und der vaskulären Integrität führen [93, 94, 142-144]. Diese sind insbesondere bei hohen Belichtungsintensitäten und langen Belichtungszeiten feststellbar und können darüber hinaus durch eine Akkumulation der Marker nach wiederholter Gabe verstärkt werden. Mit Hilfe von Bildverstärkern und spezieller Filter, welche nur die benötigten Lichtspektren applizieren, kann die Belichtungsintensität soweit reduziert werden, dass sie als unbedenklich gilt [94, 145-147]. Der Einsatz von Kameras mit hoher Lichtsensitivität führt neben einer weiteren Reduktion der Belichtungsdauer auch zu kürzeren Untersuchungszeiten, da die Aufzeichnung eine Auswertung offline erlaubt [93]. Dies macht eine wiederholte Verabreichung der Fluoreszenzmarker überflüssig und beugt somit der Akkumulation vor.

In den Versuchen wurde FITC-Dextran zur Markierung des Blutplasmas verwendet, da hierdurch auch der endotheliale Randstrombereich erfasst wird und somit der Gefäßdurchmesser mit hoher Genauigkeit gemessen werden kann [148]. Zudem findet unter Verwendung

hochmolekularen FITC-Dextranen auch bei der in den Tumorgefäßen vorhandenen erhöhten Gefäßpermeabilität kaum Extravasation statt und die gute Wasserlöslichkeit gewährleistete eine gleichmäßige und rasche intravasale Verteilung [149, 150]. Zur Leukozytenmarkierung wurde Rhodamin G6 verwendet. Für beide Marker ist eine Phototoxizität erst nach einer Belichtungsdauer von 60 Minuten zu erwarten [93, 94], welche in allen Versuchen weit unterschritten wurde.

Die intravitalmikroskopischen Messungen wurden an einem hierfür eingerichteten Arbeitsplatz durchgeführt. Da an genau diesem Versuchs-Setup in der Vergangenheit bereits Studien zu phototoxischen Effekten durchgeführt wurden [146, 151], können diese für die hier verwendete Belichtungsdauer und -intensität praktisch ausgeschlossen werden.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Einfluss der unfraktionierten und fraktionierten Magnetfeldtherapie auf LLC-1 Tumoren

Plattenepithelkarzinome können mit den derzeit zur Verfügung stehenden Therapieoptionen häufig nicht ausreichend therapiert werden, sodass hierfür neue Behandlungsstrategien wünschenswert wären.

Es konnte bereits wiederholt eine Wirksamkeit magnetischer Felder auf das Tumorstadium nachgewiesen werden, sowohl *in vitro* [54, 55, 152] als auch *in vivo* [55, 59, 61, 153, 154]. Abhängig von der Tumorentität kam es hierbei zu teilweise unterschiedlichen Effekten [54, 152]. Die Einflüsse einer statischen Magnetfeldexposition auf Plattenepithelkarzinome *in vivo* sind bisher noch weitgehend unerforscht, sodass zunächst untersucht werden sollte, wie sich Plattenepithelkarzinome *in vivo* durch eine Magnetfeldexposition beeinflussen lassen und ob sich hieraus ein therapeutischer Nutzen ableiten lässt.

Folkman *et al.* erkannten bereits 1963, dass ein entartetes Tumorstadium nur durch ein eigenständiges Blutgefäßsystem möglich wird, welches eine ausreichende Nährstoffversorgung bei gleichzeitigem Schadstoffabtransport erlaubt [99]. Da die Tumorstadiumsangiogenese somit entscheidend für die Entstehung und das Wachstum von Malignomen ist und Einflüsse durch statische Magnetfelder auf die Angiogenese beschrieben sind [49, 51, 60, 155, 156], sollten neben der Erfassung des makroskopischen Tumorstadiums auch mögliche Effekte auf mikrozirkulatorischer Ebene untersucht werden.

Das Modell der transparenten Rückenhautkammer bietet die Möglichkeit, in den ersten Tagen nach Tumorzellinokulation sowohl das flächige Tumorwachstum als auch die Tumormikrozirkulation zu untersuchen.

5.2.1.1. *Der Einfluss statischer Magnetfelder auf das Wachstum von LLC-1-Tumore*

Zunächst wurde untersucht, inwiefern die dreimalige je zweistündige Exposition gegenüber einem statischen Magnetfeld von 0,587 T das Wachstum und die Mikrozirkulation von LLC-1-Tumoren beeinflusst. Als Kontrolle dienten Tiere, die dreimalig für je zwei Stunden immobilisiert wurden – vergleichbar den Tieren während der Magnetfeldexposition – allerdings außerhalb eines Magnetfeldes.

Die dreimalige zweistündige Magnetfeldexposition führte zu einem signifikant langsamerem Tumorwachstum von LLC-1-Tumoren. Einen signifikanten Einfluss der Magnetfeldexposition auf die mikrozirkulatorischen Parameter der Erythrozytenfließgeschwindigkeit, der Gefäßdurchmesser und der funktionellen Gefäßdichte fand sich nicht. Somit scheint das nachgewiesene verlangsamte Tumorwachstum nicht auf eine Beeinflussung der Angiogenese zurückzuführen zu sein [90], anders als beispielsweise von Strelczyk *et al.* für das amelanotische Melanom des Hamsters beschrieben [59]. Allerdings war in der genannten Studie von Strelczyk *et al.* der Therapiebeginn früher gewählt, sodass das Gefäßsystem noch unausgereifter und somit anfälliger für Störeinflüsse war. Die Hypothese, dass in den von uns untersuchten LLC-1-Tumoren die Angiogenese weitgehend abgeschlossen war und ein bereits stabiles Gefäßnetzwerk bestand, wird bestätigt dadurch, dass auch die Kontrolltumore keine signifikante Zunahme der mikrozirkulatorischen Parameter über den Versuch hinweg aufwiesen. Da somit zwar der antitumorale Effekt von statischen Magnetfeldern bestätigt wird, zugleich aber kein Effekt auf die Mikrozirkulation gefunden wurde, muss ein weiterer Wirkmechanismus zu Grunde liegen.

Interessanterweise konnte an Tag 7 ein signifikant erhöhter Leukozytenflux in den Magnetfeld-exponierten Tumoren nachgewiesen werden. Da der Leukozytenflux die Anzahl an Leukozyten widerspiegelt, welche pro Zeiteinheit einen Gefäßabschnitt passieren, können der Beobachtung grundsätzlich zwei Ursachen zu Grunde liegen: Einerseits könnte eine erhöhte Anzahl an Leukozyten vorliegen, andererseits könnte eine gesteigerte Fließgeschwindigkeit in den Gefäßen die Ergebnisse erklären. Da hinsichtlich der Erythrozytenfließgeschwindigkeit keine Zunahme nachgewiesen werden konnte, muss eine erhöhte Leukozytenzahl angenommen werden. Möglicherweise führte die Magnetfeldexposition zu einer Freisetzung proinflammatorischer

Faktoren oder zu einer Hemmung antiinflammatorischer Prozesse im Tumorgewebe, welche eine zumindest lokal erhöhte Leukozytenkonzentration zur Folge hat. Tatsächlich konnte an nicht-malignem Gewebe bereits mehrfach eine Beeinflussung pro- und antiinflammatorisch wirkender Faktoren durch Magnetfelder beschrieben werden [157-162]. Laut Literatur scheint es im Allgemeinen durch Magnetfeldexposition jedoch zu einer Verschiebung in Richtung Entzündungshemmung und sinkender Leukozytenzahlen zu kommen. Tumorgewebe zeichnet sich im Vergleich zu gesundem Gewebe durch eine Aktivierung von Onkogenen und eine Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen aus, die wiederum durch eine Veränderung des Proliferations-, Wachstums- und Apoptoseverhaltens ein völlig anderes Milieu schaffen. Eine im Vergleich zu den Ergebnissen im gesunden Gewebe differente Beeinflussung von pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften ist also vorstellbar.

Des Weiteren werden Magnetfeldern eine Beeinflussung der Zelloberfläche, der Zellform und der Ausrichtung von Zellen sowie der Funktion von Ionenkanälen und Oberflächenstrukturen zugeschrieben, welche dann wiederum Einfluss auf die Zelldifferenzierung, die Zell-Zell-Erkennung und bestimmte Zelleigenschaften hatten [27, 28, 31, 32, 34, 35, 160]. Abhängig von den Unterstrukturen können verschiedene Zellarten sehr unterschiedlich auf Magnetfelder reagieren [31, 54]. In malignem Gewebe kommt es häufig zur Maskierung der entarteten Zellen, um so dem Immunsystem zu entgehen [163]. Möglicherweise kommt es durch die Magnetfeldexposition zu einer Modifikation von Oberflächenstrukturen der Tumorzellen, die somit wieder demaskiert und für das Immunsystem erkennbar und angreifbar werden. Dies würde einen gesteigerten Leukozytenflux im Sinne einer gesteigerten Immunantwort erklären, die wiederum eine Erklärung für das verzögerte Tumorwachstum unter der Magnetfeldexposition sein könnte. Allerdings sind dieser Argumentation ein gleich bleibendes Leukozytenrolling und eine unveränderte Leukozytenadhärenz entgegenzuhalten. Grundsätzlich wäre auch zu bedenken, dass Stress cortisolvermittelt eine gesteigerte Leukozytenmobilisation auslösen kann [164, 165]; hierbei wäre allerdings nicht erklärlich, warum dieser Effekt nur in Tieren, die dem Magnetfeld gegenüber ausgesetzt waren, auftrat. Als Stressor ist am ehesten das Erwecken der Tiere aus dem Schlaf und die anschließende Immobilisierung zu werten, die auch auf die Kontrolltiere einwirkte, und weniger die Magnetfeldexposition an sich.

Am zweiten Messtag ließ sich bzgl. des Leukozytenflux kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe unter der Magnetfeldtherapie mehr feststellen. Eine Resistenzentwicklung der Tumorzellen gegen die Einflüsse des Magnetfeldes könnte hierfür ausschlaggebend sein. Resistenzentwicklungen beispielsweise gegen Zytostatika werden bei

Tumoren immer wieder beobachtet. Aufgrund der in Tumoren häufig auftretenden spontanen Mutationen kann es hierbei sowohl zu einer Änderung der Zielstrukturen als auch zur Ausbildung anderer Stoffwechselwege kommen [23, 24, 163].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Magnetfeldtherapie das Wachstum von LLC-1-Tumoren *in vivo* verlangsamt. Ein denkbarer Wirkmechanismus ist hierfür ein durch das Magnetfeld bedingtes proinflammatorisches Milieu, erkennbar durch eine gesteigerte Leukozytenmobilisation.

5.2.1.2. *Der Einfluss einer stärkeren Fraktionierung der Magnetfeldexposition auf LLC-1-Tumoren in vivo*

In der Strahlentherapie haben sich unfraktionierte Therapieschemata wegen der besseren Verträglichkeit bei vergleichbarer Wirksamkeit inzwischen durchgesetzt [95, 96]. Auf Grund bislang nicht nachweisbarer Nebenwirkungen unter Magnetfeldtherapie scheint eine fraktionierte Exposition zunächst nicht zwingend erforderlich. Da Dauer, Art und Stärke der verwendeten Magnetfelder von Relevanz sind für die Veränderungen auf zellulärer Ebene [28, 33, 39, 41, 58], sind unterschiedliche funktionelle Effekte unter fraktionierter und unfraktionierter Exposition vorstellbar. Um auch in Hinblick auf weitere Studien abschätzen zu können, welche Vorbeziehungsweise Nachteile eine Fraktionierung der Magnetfeldexposition bewirkt, wurde auch hierzu eine Versuchsreihe konzipiert, in der Befunde unter unterschiedlich fraktionierter Magnetfeldexposition erhoben und mit Kontrolltumoren verglichen wurden. Zur leichteren Unterscheidung wird die oben bereits beschriebene dreimalige jeweils zweistündige Magnetfeldexposition im Folgenden als „unfraktioniert“ bezeichnet – im Vergleich zur täglichen 35-minütigen Magnetfeldexposition an neun aufeinanderfolgenden Tagen, die als „fraktionierte“ Exposition beschrieben wird.

Bei anfangs vergleichbarer Tumorgröße innerhalb aller drei Versuchsgruppen zeigten im weiteren Verlauf lediglich die Tumore nach unfraktionierter Magnetfeldexposition ein signifikant langsames Wachstum.

Die Gefäßdurchmesser blieben in allen drei Versuchsgruppen zwischen den beiden Versuchszeitpunkten konstant. Eine Abnahme des Gefäßdurchmessers, wie von Strelczyk *et al.* für das amelanotische Melanom des Hamsters beschrieben, war nicht nachweisbar. Eine mögliche Ursache für die diskrepanten Ergebnisse könnte darin begründet sein, dass verschiedene Tumorentitäten unterschiedlich auf die Magnetfeldtherapie ansprechen [31, 54].

Auch könnte der unterschiedlich früh gewählte Therapiebeginn nach Tumorinokulation, wenn die Gefäßausprossung eben erst beginnt oder das Gefäßnetzwerk bereits stabiler ist, mit den unterschiedlichen Resultaten zusammenhängen. Tatsächlich lagen in den Magnetfeld-exponierten Tumoren größere Gefäßdurchmesser vor als in den Kontrolltumoren, unter unfraktionierter Exposition nur marginalen Ausmaßes, unter fraktionierter Exposition deutlicheren Umfangs. Es wäre somit denkbar, dass es unter der Magnetfeldtherapie zu Effekten kam, welche zu einer Zunahme des Gefäßdurchmessers führten und unter der fraktionierten Therapie ausgeprägter sind oder länger andauern.

Vergleicht man nun das Tumorwachstum bis Tag 6 mit den Ergebnissen der Gefäßdurchmesser an Tag 7, zeigt sich eine klare Korrelation der beiden Parameter: In den Gruppen mit kleineren Gefäßdurchmessern wuchsen auch die Tumore langsamer. Bis zu Tag 9 wuchsen die Tumore, welche täglich einem Magnetfeld ausgesetzt wurden, schneller als die Tumore der anderen beiden Gruppen; korrelierend zum stärksten Tumorwachstum wiesen diese auch die größten Gefäßdurchmesser auf. Offenbar löst die tägliche Magnetfeldexposition Prozesse aus, die zunächst zu einem aggressiveren Tumorwachstum führen. Diese Korrelation verliert sich allerdings im weiteren Versuchsverlauf, insofern als es zum zweiten Messzeitpunkt hin in keiner der Gruppen zu einer Änderung der Gefäßparameter kam, das Tumorwachstum der Kontrollgruppe sich aber mehr beschleunigte als in den beiden Gruppen unter Magnetfeldtherapie. Dies bestätigt nochmals, dass die in der Literatur beschriebene Magnetfeld-induzierte Inhibition der Angiogenese nicht der alleinige Wirkmechanismus sein kann. Weitere denkbare Wirkmechanismen sind Vorgänge auf zellulärer Ebene, welche zur Beeinflussung von Signalkaskaden und einer geänderter Freisetzung von Transmittern führen. Dass derartige Prozesse unter dem Einfluss magnetischer Felder modifiziert werden, wurde bereits wiederholt beschrieben [29, 47, 48, 68, 166]. Viele dieser Prozesse benötigen eine gewisse Zeit, um ausgelöst zu werden oder zum Tragen zu kommen. Dies könnte der Grund sein, weshalb der Tumorwachstum-inhibierende Effekt unter zweistündiger Magnetfeldexposition besser greift als bei nur 35-minütiger Exposition. Ähnlich verhält es sich bei den Parametern der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Während unter dreimaliger zweistündiger Magnetfeldexposition an Tag 7 ein gesteigerter Leukozytenflux nachweisbar war, blieben alle Leukozyten-abhängigen Messparameter unter täglicher 35-minütiger Exposition weitgehend konstant. Umgekehrt mag die negative Korrelation zwischen Leukozytenflux und Tumorwachstum als ein Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang zwischen beiden Parametern interpretiert werden: Die meisten Tumoren entwickeln keine speziellen Antigenprogramme und exprimieren keine

costimulierenden Moleküle, wie sie für die Auslösung einer adaptiven Immunantwort notwendig sind [167]. Auch entwickeln immundefiziente Individuen prinzipiell nicht häufiger Tumoren als gesunde. Eine Ausnahme stellen hierbei virusassoziierte Tumorerkrankungen und Malignome hämatologischen Ursprungs dar, welche bei Immunsuppression gehäuft auftreten [167, 168]. Daher wird vermutet, dass das Immunsystem auf Antigene spontan entstandener solider Tumoren in der Regel nicht anspricht [167]. Das verminderte Tumorwachstum bei gesteigertem Leukozytenflux unter der unfraktionierten Magnetfeldexposition begründet sich somit vermutlich weniger in einer generellen Aktivierung des Immunsystems durch die Magnetfeldexposition, sondern könnte eher durch eine Konformationsänderung der Tumorantigene bedingt sein, welche dann eine Immunreaktion auslöst [27, 28, 75, 167].

5.2.2. Der Einfluss einer Magnetfeldexposition auf die Cetuximabtherapie bei LLC-1-Tumoren

Der EGFR-Antikörper Cetuximab wird in der Therapie von humanen Plattenepithelkarzinomen bereits erfolgreich eingesetzt. Zielstruktur des Antikörpers ist die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors, um welche er mit dem physiologisch vorhandenen EGF konkurriert [10-13]. Nach der Bindung von EGF werden Signalkaskaden in Gang gesetzt, welche die Umgehung zahlreicher antitumorale Kontrollmechanismen ermöglicht und so in einem für EGFR-exprimierende Tumorzellen unkontrollierten Wachstum mit einer erhöhten Metastasierungstendenz resultieren [169]. Bindet jedoch Cetuximab an den Rezeptor, werden diese Signalkaskaden gehemmt und die Zellen verfallen in einen Zellzyklusarrest. Zudem kommt es zu einer Hemmung der VEGF-Expression, woraus sich eine verminderte Tumorangiogenese ergibt [14, 16, 170, 171].

Unter der Cetuximab-Monotherapie zeigen sich nur geringe therapeutische Effekte; in Kombination mit Radiotherapieschemata kann jedoch eine bessere Tumorkontrolle und eine Verlängerung des mittleren Überlebens erreicht werden [170, 172, 173]. Aufgrund des bekannten Nebenwirkungsprofils der Bestrahlung, das gemäß der Fachinformationen zu Cetuximab durch die konkomitante Cetuximabgabe verstärkt wird, und vor dem Hintergrund, dass diese Therapieoption einer Radiatio bei Rezidivtumoren häufig bereits ausgeschöpft wurde, erscheint die Kombination von Cetuximab mit Magnetfeldern als interessant.

5.2.2.1. *Der therapeutische Effekt des chimären Antikörpers Cetuximab auf murine LLC-1-Tumore in vivo*

Der EGFR- Antikörper Cetuximab wurde zur Therapie von Tumoren des menschlichen Organismus konzipiert. Der therapeutische Effekt von Cetuximab auf humane Tumorzelllinien wurde in Vergangenheit sowohl *in vitro* [19, 174-177] als auch *in vivo* [19, 175, 178, 179] zahlreich untersucht und bestätigt – anders als im Zusammenhang mit murinen Tumorzelllinien. Daher wurden das Tumorwachstum und mikrozirkulatorische Parameter in LLC-1-Tumoren unter Cetuximabtherapie untersucht und mit unbehandelten Kontrolltumoren *in vivo* verglichen, Die intraperitoneale Cetuximabinjektion erfolgte an den Tagen 3, 6 und 9 nach Tumorzellinokulation. Den Kontrolltieren wurde die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung statt Cetuximab intraperitoneal injiziert.

Die Tumorgröße war bei Therapiebeginn in beiden Gruppen weitgehend vergleichbar. Bei Versuchende waren die Tumore unter Cetuximabtherapie jedoch signifikant kleiner als die Kontrolltumore. Somit konnte erstmals eine Wirkung von Cetuximab auf murine LLC-1-Tumore nachgewiesen werden. Auch wenn Cetuximab somit einen relevanten antitumoralen Effekt in murinen LLC-1-Tumoren *in vivo* zeigt, ist der zugrunde liegende Mechanismus bislang nicht geklärt.

Die intravitalmikroskopisch erhobenen Parameter der Mikrozirkulation zeigten keine signifikanten Unterschiede. Dies verwundert *prima vista* insofern, als eine verminderte Angiogenese unter Cetuximab beschrieben ist [14, 16, 180] und somit für die Parameter der Mikrozirkulation unter Cetuximabtherapie eine Abnahme zwischen den Untersuchungszeitpunkten zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise liegt dieses abweichende Ergebnis darin begründet, dass Cetuximab gar nicht oder nicht ausreichend an den EGF-Rezeptor in murinen LLC-1-Tumoren bindet. Dann wäre davon auszugehen, dass die antitumorale Wirkung von Cetuximab auf LLC-1-Tumore nicht im klassischen Sinne EGF-rezeptorvermittelt ist. Umgekehrt ist die auch unter Cetuximabgabe unveränderte Mikrozirkulation kein Beweis dafür, dass Cetuximab nicht an EGF-Rezeptoren in LLC-1-Tumore bindet – auch eine andere Erklärung für die fehlenden Zeichen einer Antiangiogenese wäre denkbar: Cetuximab führt zu einer Hemmung der VEGF-Expression, woraus sich eine verminderte Tumorangiogenese ergibt. Nach Beginn der Cetuximabtherapie liegt jedoch noch bereits synthetisiertes VEGF vor. Da Cetuximab mit EGF um die Rezeptorbindung konkurriert,

kommt die Synthese auch nicht vollständig zum Erliegen, sondern wird nur deutlich gesenkt. Diese verzögerte Cetuximabwirkung könnte erklären, weshalb hinsichtlich der Gefäßarchitektur noch keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen waren. Die dennoch nachgewiesene Verlangsamung des Tumorwachstums unter Cetuximabgabe kann auf andere Wirkmechanismen des Cetuximab zurückzuführen sein, z.B. den Cetuximab-induzierten Zellzyklusarrest. Des Weiteren wäre es denkbar, dass Cetuximab den murinen EGF-Rezeptor nicht binden konnte und der wachstumshemmende Effekt auf anderen Mechanismen beruht.

Um auszuschließen, dass der für das Tumorwachstum zu verzeichnende Effekt nicht eine Reaktion gegen den humanen Anteil des Antikörpers widerspiegelt, wurden Versuche im immundefizienten Modell durchgeführt, wie im Abschnitt 5.2.3 diskutiert.

5.2.2.2. Der Einfluss einer Magnetfeldexposition auf die Cetuximabtherapie bei LLC-1-Tumoren in vivo

Es sollte geklärt werden, ob statische Magnetfelder die Cetuximabwirkung beeinflussen und ob sich hieraus ein therapeutischer Vorteil gegenüber der alleinigen Cetuximabtherapie ergibt. Hierzu wurden Versuchsgruppen unter einer unfraktionierten beziehungsweise fraktionierten Magnetfeldtherapie in Kombination mit Cetuximab, eine Versuchsgruppe unter Cetuximab-Monotherapie und eine untherapierte Kontrollgruppe verglichen. Die Tiere aller Gruppen erhielten an den Tagen 3, 6 und 9 jeweils eine intraperitoneale Injektion von Cetuximab oder dem gleichen Volumen an physiologischer Kochsalzlösung abhängig von der Gruppenzugehörigkeit.

Vor Therapiebeginn zeigten alle Gruppen ähnliche Tumorgrößen, sodass auch hier vergleichbare Ausgangsbedingungen vorlagen. Ebenso zeigten alle Gruppen zwischen den Untersuchungstagen ein stetiges Tumorwachstum.

Die mit Cetuximab als Monotherapie behandelten Tumore wuchsen am langsamsten. Die Kombination der Cetuximabgabe mit einer Magnetfeldexposition ergab keinen Vorteil - anders als im Rahmen einer additiven Wirkung beider Therapiestrategien, des Cetuximab und der Magnetfeldexposition, vorstellbar gewesen wäre. Tatsächlich war die Cetuximabbehandlung als Monotherapie am effektivsten. Bei Kombination von Cetuximab mit Magnetfeldexposition trat jeweils nur derjenige antitumorale Effekt ein, der auch unter alleiniger Magnetfeldexposition als

Monotherapie erreicht wurde. Unabhängig des bislang unbekanntenen Wirkmechanismus von Cetuximab auf murine LLC-1-Tumore, kann daher davon ausgegangen werden, dass statische Magnetfelder die Wirkung des Cetuximab blockieren. Unter Annahme der Hypothese, dass Cetuximab doch an den EGF-Rezeptor in LLC-1-Tumore binden kann, könnte beispielsweise vermutet werden, dass statische Magnetfelder die Funktion des EGF-Rezeptors stören, sodass Cetuximab wirkungslos bleibt. Eine mögliche Erklärung hierfür liefern die Erkenntnisse von Zhang *et al.*: Die Arbeitsgruppe konnte *in vitro* nachweisen, dass es unter dem Einfluss statischer Magnetfelder zu einer Ladungsverschiebung im EGF-Rezeptor kommt und daraus möglicherweise veränderte Bindungseigenschaften resultieren: Sollte Cetuximab an EGF-Rezeptoren in LLC-1-Tumore binden, führen statische Magnetfelder möglicherweise zu einer deutlich herabgesetzten Bindungsaffinität des Cetuximab-Antikörpers. Allerdings ergäbe sich daraus, dass statische Magnetfelder die natürliche Bindung von EGF an seinen Rezeptor weniger stark zu inhibieren scheinen als der konkurrierende Antikörper Cetuximab, da die alleinige Gabe von Cetuximab das Tumorstadium stärker inhibiert als eine alleinige Magnetfeldexposition. Gegen diese Hypothese wiederum spricht, dass der antitumorale Effekt der Magnetfeldexposition durch zusätzliche Gabe von Cetuximab nicht noch weiter verstärkt wird, sondern stattdessen überhaupt keine Änderung erfährt.

Letztlich sind auch weitere Erklärungen vorstellbar, warum Cetuximab als Monotherapie besser wirkt als statische Magnetfelder in alleiniger Anwendung: Möglicherweise blockieren statische Magnetfelder lediglich den Start der EGF-Rezeptor-abhängigen Signalkaskade, wohingegen Cetuximab bei Anwendung in humanen Tumoren neben der ebenfalls induzierten Blockade des EGF-Rezeptors noch einen weiteren antitumoralen Wirkmechanismus aufweist. Hierbei ist insbesondere an die Cetuximab-induzierte zellvermittelte Zytotoxizität zu denken [181, 182]. Die Beobachtung jedoch, dass unter Kombination von Magnetfeldexposition und Cetuximab genau die gleiche antitumorale Wirkung erzeugt wird wie unter alleiniger Magnetfeldtherapie, spräche dafür, dass Magnetfelder auch die weiteren antitumoralen Prozesse von Cetuximab – jenseits der EGFR-abhängigen Signalkaskade – unterbinden. Diese Hemmung scheint allerdings nur in Gegenwart von Cetuximab zu erfolgen; andernfalls wäre eine isolierte Magnetfeldtherapie genauso effizient wie eine Cetuximab-Monotherapie. Aufgrund der unklaren Bindung von Cetuximab an murine EGF-Rezeptoren in LLC-1-Tumore sind die genannten Überlegungen rein hypothetisch. Grundsätzlich wäre auch denkbar, dass durch die Magnetfeldtherapie nicht nur der EGF-Rezeptor eine Änderung erfährt, sondern auch der Antikörper Cetuximab an sich, wodurch dieser dann wirkungslos wird. Allerdings sprechen Ergebnisse aus Studien zu magnetic drug

targeting mit Cetuximab dagegen [183], dass Magnetfeldexposition zu einer direkten Inaktivierung von Cetuximab führt.

Bezüglich des Gefäßdurchmessers und der funktionellen Gefäßdicke ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit nahm lediglich in Kontrolltumoren tendenziell zu; in allen Therapiegruppen blieb sie weitgehend gleich oder nahm sogar ab. Dies mag durch eine leichtgradige Antiangiogenese, wie sie für Cetuximabgabe [184-187] in humanen Tumoren oder für Magnetfeldexposition [48, 59] beschrieben sind, zu erklären sein.

Die Untersuchung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zeigte zum ersten Messzeitpunkt keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Zum zweiten Messzeitpunkt am Versuchsende war unter der Kombination aus fraktionierter Magnetfeldexposition und Cetuximab ein erhöhter Leukozytenflux nachweisbar, passend zur gesteigerten Fließgeschwindigkeit des Blutes. Allerdings war auch in der Gruppe der Kombinationstherapie aus unfraktionierter Magnetfeldexposition und Cetuximab der Leukozytenflux signifikant erhöht. In dieser Gruppe ist dieser Effekt jedoch nicht durch eine erhöhte Fließgeschwindigkeit des Blutes erklärlich. Somit scheint die Anzahl der Leukozyten an sich erhöht. Hier ist ein Wirkmechanismus denkbar, der erst unter Kombination beider Therapieverfahren – der Cetuximabgabe und der Magnetfeldexposition – auftritt; denn bei keiner Monotherapie war ein gesteigerter Leukozytenflux gegen Versuchsende nachweisbar.

5.2.3. Evaluierung möglicher immunologischer Reaktionen gegen Cetuximab im Mausmodell

Cetuximab ist ein chimärer IgG- Antikörper, welcher einen murinen und einen humanen Anteil aufweist. Die F_v- Region ist hierbei murinen Ursprungs, die konstante Region humaner Herkunft. Im menschlichen Körper ist daher weniger mit einer Immunreaktion gegen den Antikörper zu rechnen als im Mausmodell [188].

Um dies zu überprüfen, erfolgte die Untersuchung der Cetuximabwirkung auf LLC-1-Tumore *in vivo* auch im immundefizienten Tier.

Auch im immundefizienten Modell kam es zwischen allen Untersuchungstagen zu einem Tumorwachstum. Während an Tag 3 keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Tumorgröße vorlagen, zeigten sich an den folgenden Tagen im immundefizienten Modell größere Tumoren. In beiden Modellen zeigte Cetuximab die erwartete antitumorale Wirkung.

Allerdings war im immundefizienten Tier bereits an Tag 6 ein signifikanter Größenunterschied zwischen Cetuximab- und Placebothherapie nachweisbar, wohingegen im immunkompetenten Modell erst an Tag 12 Signifikanz erreicht wurde. Vermutlich ist dies im insgesamt gesteigerten Tumorwachstum in den immundefizienten Tieren bedingt, das schneller eine statistische Signifikanz erreichen lässt. Immerhin hätte die genuine Immundepression in den CD1nu/nu-Mäusen eine herabgesetzte Antikörper-abhängige Zell-medierte Zytotoxizität erwarten lassen.

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit und der Gefäßdurchmesser nahmen im immundefizienten Modell in beiden Gruppen im Versuchsverlauf signifikant zu, wohingegen im immunkompetenten Tier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tagen auftraten. Dieser Effekt korreliert mit dem schnelleren Tumorwachstum in immundefizienten Tieren, verglichen zu immunkompetenten Tieren. Beide Parameter weisen auf eine bessere Durchblutung hin, die wiederum das schnellere Tumorwachstum erklärt, da eine bessere Sauerstoffzufuhr und ein schnellerer Schadstoffabtransport möglich sind [189]. Anders als die Erythrozytenfließgeschwindigkeit und der Gefäßdurchmesser nahm die funktionelle Gefäßdichte nur in den immundefizienten Kontrolltumoren signifikant zu als Zeichen einer gesteigerten Angiogenese, die unter Cetuximab im immundefizienten Tier offenbar ausbleibt. Somit kann zumindest im immundefizienten Mausmodell der bereits vielfach beschriebene anti-angiogenetische Effekt von Cetuximab bestätigt werden [184-187]. Interessanterweise war die Inhibition der Tumorangiogenese durch Cetuximab im immunkompetenten Tier nicht nachzuweisen offenbar in Folge des funktionierenden Immunsystems.

Die Parameter der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zeigten, wie erwartet, andere Veränderungen im immundefizienten Mausmodell als in immunkompetenten Tieren: Die Zunahme des Leukozytenflux zwischen den Untersuchungstagen im immundefizienten Modell ist durch die direkt proportionale Zunahme der Fließgeschwindigkeit leicht erklärbar. Leukozytenrolling und Leukozytenadhärenz als Parameter für die Leukozytenmigration erfuhren in immundefizienten Tieren jedoch ebenfalls eine Änderung im Sinne einer Abnahme als Zeichen einer reduzierten Leukozytenmigration. Griffioen *et al.* beschrieben 1998, dass Tumoren Faktoren sezernieren, welche die Expression von Adhäsionsmolekülen unterdrücken [190]. Offensichtlich geschieht dies bei Immundefizienz früher beziehungsweise ausgeprägter als bei funktionierendem Immunsystem. Sehr wahrscheinlich ist diese Beobachtung ein möglicher Faktor für das gesteigerte Tumorwachstum bei immundefizienten Grundbedingungen.

Zusammengefasst kommt es unter Immundefizienz zu einem gesteigerten Tumorwachstum. Dies scheint multifaktoriell bedingt zu sein: Die offensichtlich unter Immundefizienz gesteigerte Angiogenese verbessert die Durchblutung des Tumorgewebes und ermöglicht somit ein rascheres Tumorwachstum. Darüber hinaus mag die im immundefizienten Tier reduzierte Immunreaktion gegen das maligne Gewebe, erkennbar durch die verminderte Leukozytenmigration, das Tumorwachstum begünstigen. Zwar könnte man auch argumentieren, dass ein Teil der antitumoralen Cetuximabwirkung im immunkompetenten Tier allein auf die gesteigerte Immunreaktion auf den humanen Antikörperbestandteil zurückzuführen sei. Andererseits lässt sich diese Argumentation weitgehend entkräften durch die Tatsache, dass Tumore unter Cetuximab im immunkompetenten Mausmodell keine Änderung des Leukozytenrolling und der Leukozytenadhärenz gegenüber unbehandelten Kontrolltumoren erfuhren. Wäre die murine Immunreaktion auf die humane Cetuximabregion von größerer funktioneller Relevanz, hätte eine gesteigerte Leukozyten-Endothelzellinteraktion unter Cetuximabgabe verglichen mit placebobehandelten Tieren nachweisbar sein müssen.

5.2.5. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine antitumorale Wirkung von statischen Magnetfeldern auf Plattenepithelkarzinome, möglicherweise bedingt durch eine Blockade des EGFR-Signallings, die gemäß der Literatur am ehesten auf einer Magnetfeld-induzierten Veränderung der Ladungseigenschaften des EGF-Rezeptors basiert. Da für die Magnetfeldexposition bislang keine relevanten Nebenwirkungen beschrieben sind, erscheint die Magnetfeldexposition als ernstzunehmende Alternative zur konventionellen medikamentösen EGFR-Targeted-Therapie, die im Allgemeinen zwar weniger Nebenwirkungen aufweist als eine konventionelle Chemotherapie, selbst aber auch nicht frei von unerwünschten Arzneimittelreaktionen ist und insbesondere aufgrund immunologischer Reaktionen mitunter abgebrochen werden muss. Allerdings ist zur Etablierung einer Magnetfeldtherapie in der Onkologie weitere Grundlagenforschung notwendig, insbesondere um den zu Grunde liegenden Pathomechanismus auf molekularer Ebene besser zu verstehen. Entsprechend der Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit müssen auch die Einflüsse statischer Magnetfelder auf das inflammatorische Milieu von Tumoren untersucht werden. Um die antitumorale Wirkung von Cetuximab auch im verwendeten murinen Tumormodell besser einordnen zu können, sollte

zudem eine Bindung des Cetuximab-Antikörpers an den EGF-Rezeptor der LLC-1-Zellen überprüft werden. Dies könnte beispielsweise immunhistochemisch erfolgen. Auch wären FACS-Analysen von Tumorzellen und Blutbestandteilen mit und ohne Cetuximabinkubation sowie unter und nach Magnetfeldexposition sinnvoll. Ebenso müssen Langzeituntersuchungen erfolgen, die Aussagen über anhaltende Therapiewirkungen aber auch möglicherweise erst mit Latenz auftretende Nebenwirkungen oder Resistenzentwicklungen erlauben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches zählen zu den häufigsten Tumorerkrankungen weltweit. Trotz intensiver Forschung hat sich die Prognose für Patienten, die an diesen Malignomen leiden, in den letzten Jahrzehnten kaum verändert. Ein Grund hierfür ist die Problematik, dass Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs häufig Rezidiv- oder Residualkarzinome entwickeln, die einer Therapie nur noch schwer zugänglich sind, nachdem bei Behandlung des Primärkarzinoms die konventionellen Therapieoptionen bereits ausgeschöpft wurden. Somit ist die Etablierung neuer, gut verträglicher Therapieoptionen von großer Wichtigkeit.

Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche potentielle Therapiekonzepte als Monotherapie sowie in Kombination miteinander untersucht werden. Der erste Schwerpunkt war dabei die Magnetfeldtherapie, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vielversprechende antitumorale Wirkung gezeigt hat, bislang aber noch nicht bei EGFR-überexprimierenden Tumoren untersucht wurde. Der zweite Schwerpunkt sollte die Untersuchung der Kombination von Magnetfeldtherapie und der bei Kopf-Hals-Tumoren bereits etablierten Gabe von Cetuximab, in humanen Tumoren im Sinne einer EGFR-Targeted-Therapie, darstellen: *In vitro*-Versuche konnten einen Einfluss von Magnetfeldern auf den EGF-Rezeptor nachweisen; die Analyse, inwiefern dieser Effekt *in vivo* von funktioneller Relevanz ist, fehlt jedoch bislang.

Als Tumormodell dienten murine LLC-1-Tumore, die in Rückenhautkammern von Mäusen implantiert wurden und - ähnlich den Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region - EGFR überexprimieren. Das Modell der transparenten Rückenhautkammer wiederum eignete sich hervorragend, um neben dem Tumorwachstum auch mikrozirkulatorische Veränderungen sowie die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zu erfassen.

Zunächst wurde der Einfluss statischer Magnetfelder auf LLC-1-Tumore untersucht, wobei in Anlehnung an die Fraktionierung bei konventioneller Radiotherapie unterschiedlich fraktionierte Expositionsschemata zur Anwendung kamen. Insgesamt führte die Magnetfeldexposition zu einem verlangsamten Tumorwachstum, wobei eine längere Exposition trotz insgesamt seltenerer Anwendung eine signifikant bessere Tumorkontrolle ermöglichte als eine hohe Frequenz kürzerer Exposition. Ein Grund hierfür ist möglicherweise ein gesteigerter Leukozytenflux als Hinweis auf ein pro-inflammatorisches Milieu.

Das nächste Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, inwiefern Cetuximab, der einzige in Europa zugelassene Antikörper zur EGFR-Targeted-Therapie bei Kopf-Hals-Karzinomen, das Wachstum von murinen LLC-1-Tumoren beeinflusst und ob diese Wirkung ihrerseits durch statische Magnetfelder *in vivo* modifiziert wird. Zunächst konnte erstmals gezeigt werden, dass Cetuximab als Monotherapie zu einem signifikant langsameren Wachstum von murinen LLC-1-Tumoren führt. Eine antiangiogenetische Wirkung, wie für Cetuximab bei Anwendung an humanen Tumoren beschrieben, trat nicht ein. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die antitumorale Wirkung von Cetuximab auf LLC-1-Tumore nicht direkt rezeptorvermittelt ist, sondern andere Wirkmechanismen dem wachstumsinhibierenden Effekt des Cetuximab zu Grunde liegen.

Die gute antitumorale Wirkung von Cetuximab konnte durch Kombination mit Magnetfeldexposition, unabhängig von dessen Expositionsschema, nicht gesteigert werden. Vielmehr nahm der wachstumsinhibierende Effekt von Cetuximab unter Kombination mit Magnetfeldexposition ab. Da der antitumorale Effekt der Magnetfeldexposition durch eine zusätzliche Cetuximabgabe keinerlei Veränderung erfuhr, kann davon ausgegangen werden, dass statische Magnetfelder die Effekte einer Cetuximabtherapie blockieren. Unter Voraussetzung einer wirksamen Bindung von Cetuximab an den EGF-Rezeptor in LLC-1-Tumoren, könnte hierfür eine Ladungsverschiebung im EGF-Rezeptor, hervorgerufen durch die Magnetfeldexposition, verantwortlich sein, welche in Folge die Bindungsaffinität des Cetuximab-Antikörpers herabsetzt. Auch könnte eine Magnetfeld-induzierte Modifikation des Cetuximab-Antikörpers selbst ursächlich sein. Bei der intravitalmikroskopischen Untersuchung lieferte insbesondere die Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion interessante Ergebnisse: Als erste wichtige Beobachtung ist zu werten, dass Cetuximab die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nicht beeinflusste. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die nachgewiesene antitumorale Wirkung von Cetuximab nicht allein auf der murinen Immunreaktion gegen den humanen Anteil des Antikörpers Cetuximab basiert. Ein zweites interessantes Leukozyten-bezogenes Ergebnis betrifft die Kombinationstherapien aus Cetuximabgabe und Magnetfeldexposition: Unabhängig ob in Kombination mit Cetuximab oder als Monotherapie, wurde bei längerer aber dafür seltenerer Magnetfeldexposition das Tumorstadium stärker gehemmt als bei häufigerer aber kürzerer Magnetfeldexposition mit oder ohne Cetuximab. In diesen langsamer wachsenden Tumoren war - anders als in den schneller wachsenden Tumoren - der Leukozytenflux deutlich gesteigert bei weitgehend gleicher Erythrozytenfließgeschwindigkeit. Dies lässt vermuten, dass unter ausreichend langer

Magnetfeldexposition ein proinflammatorisches Milieu gefördert wird, das möglicherweise das Tumorwachstum inhibiert. Der dem proinflammatorischen Milieu zugrunde liegende Pathomechanismus konnte in unserem Modell allerdings nicht geklärt werden.

Um auszuschließen, dass die unter Cetuximab zu beobachtenden Einflüsse primär auf einer immunologischen Reaktion gegen den humanen Anteil des chimären Antikörpers Cetuximab und nicht auf der eigentlichen Cetuximab-Bindung beruhen, erfolgte abschließend eine Versuchsreihe im immundefizienten Mausmodell der CD1nu/nu-Maus. Dabei zeigten alle immundefizienten Mäuse ein aggressiveres Tumorwachstum als die immunkompetenten Tiere, begleitet von einer stärkeren Tumorangiogenese und reduzierten Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen. Da diese Beobachtungen an allen immundefizienten Tieren nachweisbar waren, also auch in den Kontrolltieren, ergab sich kein Anhalt für eine ausgeprägte immunologische Reaktion auf den humanen Cetuximab-Antikörperanteil im immunkompetenten Mausmodell.

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefasst, konnte erstmals gezeigt werden, dass die alleinige Anwendung von statischen Magnetfeldern das Wachstum von EGFR-überexprimierenden Tumoren *in vivo* hemmt, wobei dem Expositionsintervall eine entscheidende Rolle zukommt: Nur eine seltenere, dafür längere Magnetfeldexposition zeigte eine signifikante Wachstumshemmung, wohingegen eine häufigere, aber zugleich kürzere Exposition nur zu einer leichten Inhibition des Tumorwachstums führte – bei in Summe vergleichbarer Expositionszeit. Anders als erhofft, konnte eine weitere Wirkungssteigerung durch die Kombination der Magnetfeldexposition mit Cetuximab nicht erreicht werden, zumindest nicht in dem verwendeten murinen Tumormodell.

Da bislang, anders als unter Cetuximabtherapie, keine Nebenwirkungen unter Magnetfeldexposition beschrieben worden sind, lässt die vorliegende Arbeit die Anwendung statischer Magnetfelder in der Therapie von EGFR-überexprimierenden Tumoren als zukunftssträchtige Perspektive erscheinen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Kademani, D., *Oral cancer*. Mayo Clin Proc, 2007. **82**(7): p. 878-87.
2. Duvvuri, U. and J.N. Myers, *Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide*. Curr Probl Surg, 2009. **46**(2): p. 114-7.
3. Barnes, B., et al. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016 [cited.
4. Reiß, M., *Facharztwissen HNO- Heilkunde*, ed. M. Reiß. 2009: Springer Medizin Verlag Heidelberg. 1172.
5. Aktories, K., et al., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 11. Auflage ed, ed. K. Aktories, et al. 2013, München: Urban & Fischer Verlag.
6. Link, H. *ONKODIN: Onkologie, Hämatologie - Daten und Informationen*. [cited.
7. Le Tourneau, C. and L.L. Siu, *Molecular-targeted therapies in the treatment of squamous cell carcinomas of the head and neck*. Curr Opin Oncol, 2008. **20**(3): p. 256-63.
8. Okamoto, I., *Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR-targeted anticancer therapy*. Febs J, 2010. **277**(2): p. 309-15.
9. West, C.M., L. Joseph, and S. Bhana, *Epidermal growth factor receptor-targeted therapy*. Br J Radiol, 2008. **81 Spec No 1**: p. S36-44.
10. Fan, Z., et al., *Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(44): p. 27595-602.
11. Ferguson, K.M., *Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 5): p. 742-5.

-
12. Li, S., et al., *Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(4): p. 301-11.
 13. Waksal, H.W., *Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 1999. **18**(4): p. 427-36.
 14. Huang, S.M. and P.M. Harari, *Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(6): p. 2166-74.
 15. Peng, D., et al., *Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145*. *Cancer Res*, 1996. **56**(16): p. 3666-9.
 16. Vincenzi, B., et al., *The biological properties of cetuximab*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008. **68**(2): p. 93-106.
 17. Ciardiello, F., et al., *Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225*. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(4): p. 909-16.
 18. Wu, X., et al., *Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(4): p. 1897-905.
 19. Harding, J. and B. Burtneess, *Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody*. *Drugs Today (Barc)*, 2005. **41**(2): p. 107-27.
 20. Adams, G.P. and L.M. Weiner, *Monoclonal antibody therapy of cancer*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(9): p. 1147-57.

-
21. Levy, E.M., et al., *Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells*. *Innate Immun*, 2009. **15**(2): p. 91-100.
 22. Specenier, P. and J.B. Vermorken, *Cetuximab: its unique place in head and neck cancer treatment*. *Biologics*, 2013. **7**: p. 77-90.
 23. Vecchione, L., et al., *EGFR-targeted therapy*. *Exp Cell Res*, 2011. **317**(19): p. 2765-71.
 24. Willis, R.E., *Targeted Cancer Therapy: Vital Oncogenes and a New Molecular Genetic Paradigm for Cancer Initiation Progression and Treatment*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(9).
 25. Hofheinz, R.D., et al., *Management of adverse events during treatment of gastrointestinal cancers with epidermal growth factor inhibitors*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2017. **114**: p. 102-113.
 26. Bawin, S.M., W.R. Adey, and I.M. Sabbot, *Ionic factors in release of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ from chicken cerebral tissue by electromagnetic fields*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978. **75**(12): p. 6314-8.
 27. Chionna, A., et al., *Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure*. *Eur J Histochem*, 2003. **47**(4): p. 299-308.
 28. Dini, L. and L. Abbro, *Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures*. *Micron*, 2005. **36**(3): p. 195-217.
 29. Lew, W.Z., et al., *Static magnetic fields enhance dental pulp stem cell proliferation by activating the p38 mitogen-activated protein kinase pathway as its putative mechanism*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2016.
 30. Liboff, A.R. and B.R. McLeod, *Kinetics of channelized membrane ions in magnetic fields*. *Bioelectromagnetics*, 1988. **9**(1): p. 39-51.
-

-
31. Rosen, A.D., *Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems*. Cell Biochem Biophys, 2003. **39**(2): p. 163-73.
 32. Mhamdi, L., et al., *Effect of a static magnetic field on Escherichia coli adhesion and orientation*. Can J Microbiol, 2016. **62**(11): p. 944-952.
 33. Flipo, D., et al., *Increased apoptosis, changes in intracellular Ca²⁺, and functional alterations in lymphocytes and macrophages after in vitro exposure to static magnetic field*. J Toxicol Environ Health A, 1998. **54**(1): p. 63-76.
 34. Higashi, T., et al., *Orientation of erythrocytes in a strong static magnetic field*. Blood, 1993. **82**(4): p. 1328-34.
 35. Umeno, A. and S. Ueno, *Quantitative analysis of adherent cell orientation influenced by strong magnetic fields*. IEEE Trans Nanobioscience, 2003. **2**(1): p. 26-8.
 36. Jia, C., et al., *EGF receptor clustering is induced by a 0.4 mT power frequency magnetic field and blocked by the EGF receptor tyrosine kinase inhibitor PD153035*. Bioelectromagnetics, 2007. **28**(3): p. 197-207.
 37. Anand, A., et al., *Pre-treatment of seeds with static magnetic field ameliorates soil water stress in seedlings of maize (Zea mays L.)*. Indian J Biochem Biophys, 2012. **49**(1): p. 63-70.
 38. Belyavskaya, N.A., *Biological effects due to weak magnetic field on plants*. Adv Space Res, 2004. **34**(7): p. 1566-74.
 39. Fanelli, C., et al., *Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca²⁺ influx*. Faseb J, 1999. **13**(1): p. 95-102.
 40. Kim, S.C., A. Mason, and W. Im, *Enhancement of the Initial Growth Rate of Agricultural Plants by Using Static Magnetic Fields*. J Vis Exp, 2016(113).

-
41. Mansourian, M., H.R. Marateb, and G. Vaseghi, *The effect of extremely low-frequency magnetic field (50-60 Hz) exposure on spontaneous apoptosis: The results of a meta-analysis*. Adv Biomed Res, 2016. **5**: p. 141.
 42. Shine, M.B., K.N. Guruprasad, and A. Anand, *Enhancement of germination, growth, and photosynthesis in soybean by pre-treatment of seeds with magnetic field*. Bioelectromagnetics, 2011. **32**(6): p. 474-84.
 43. Brix, G., et al., *Static magnetic fields affect capillary flow of red blood cells in striated skin muscle*. Microcirculation, 2008. **15**(1): p. 15-26.
 44. Gmitrov, J., C. Ohkubo, and H. Okano, *Effect of 0.25 T static magnetic field on microcirculation in rabbits*. Bioelectromagnetics, 2002. **23**(3): p. 224-9.
 45. Ichioka, S., et al., *High-intensity static magnetic fields modulate skin microcirculation and temperature in vivo*. Bioelectromagnetics, 2000. **21**(3): p. 183-8.
 46. Yamamoto, T., Y. Nagayama, and M. Tamura, *A blood-oxygenation-dependent increase in blood viscosity due to a static magnetic field*. Phys Med Biol, 2004. **49**(14): p. 3267-77.
 47. Delle Monache, S., et al., *Extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) induce in vitro angiogenesis process in human endothelial cells*. Bioelectromagnetics, 2008. **29**(8): p. 640-8.
 48. Delle Monache, S., et al., *Inhibition of angiogenesis mediated by extremely low-frequency magnetic fields (ELF-MFs)*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79309.
 49. Ruggiero, M., et al., *0.2 T magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane*. Bioelectromagnetics, 2004. **25**(5): p. 390-6.
 50. Tepper, O.M., et al., *Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF-2*. Faseb J, 2004. **18**(11): p. 1231-3.
-

-
51. Wang, Z., et al., *Inhibitory effects of a gradient static magnetic field on normal angiogenesis*. *Bioelectromagnetics*, 2009. **30**(6): p. 446-53.
 52. Yuan, Y., et al., *Pulsed magnetic field induces angiogenesis and improves cardiac function of surgically induced infarcted myocardium in Sprague-Dawley rats*. *Cardiology*, 2010. **117**(1): p. 57-63.
 53. Pacini, S., et al., *Influence of static magnetic field on the antiproliferative effects of vitamin D on human breast cancer cells*. *Oncol Res*, 1999. **11**(6): p. 265-71.
 54. Raylman, R.R., A.C. Clavo, and R.L. Wahl, *Exposure to strong static magnetic field slows the growth of human cancer cells in vitro*. *Bioelectromagnetics*, 1996. **17**(5): p. 358-63.
 55. Tofani, S., et al., *Static and ELF magnetic fields induce tumor growth inhibition and apoptosis*. *Bioelectromagnetics*, 2001. **22**(6): p. 419-28.
 56. Sabo, J., et al., *Effects of static magnetic field on human leukemic cell line HL-60*. *Bioelectrochemistry*, 2002. **56**(1-2): p. 227-31.
 57. Sarimov, R., et al., *Exposure to ELF magnetic field tuned to Zn inhibits growth of cancer cells*. *Bioelectromagnetics*, 2005. **26**(8): p. 631-8.
 58. Strieth, S., et al., *Static magnetic fields induce blood flow decrease and platelet adherence in tumor microvessels*. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(6): p. 814-9.
 59. Strelczyk, D., et al., *Static magnetic fields impair angiogenesis and growth of solid tumors in vivo*. *Cancer Biol Ther*, 2009. **8**(18): p. 1756-62.
 60. Gellrich, D., S. Becker, and S. Strieth, *Static magnetic fields increase tumor microvessel leakiness and improve antitumoral efficacy in combination with paclitaxel*. *Cancer Lett*, 2014. **343**(1): p. 107-14.

-
61. Tofani, S., et al., *Increased mouse survival, tumor growth inhibition and decreased immunoreactive p53 after exposure to magnetic fields*. Bioelectromagnetics, 2002. **23**(3): p. 230-8.
 62. Tofani, S., et al., *Static and ELF magnetic fields enhance the in vivo anti-tumor efficacy of cis-platin against lewis lung carcinoma, but not of cyclophosphamide against B16 melanotic melanoma*. Pharmacol Res, 2003. **48**(1): p. 83-90.
 63. Chen, W.F., et al., *Static magnetic fields enhanced the potency of cisplatin on k562 cells*. Cancer Biother Radiopharm, 2010. **25**(4): p. 401-8.
 64. Gray, J.R., C.H. Frith, and J.D. Parker, *In vivo enhancement of chemotherapy with static electric or magnetic fields*. Bioelectromagnetics, 2000. **21**(8): p. 575-83.
 65. Sun, R.G., et al., *Biologic effects of SMF and paclitaxel on K562 human leukemia cells*. Gen Physiol Biophys, 2012. **31**(1): p. 1-10.
 66. Zhang, K., et al., *Decreased P-glycoprotein is associated with the inhibitory effects of static magnetic fields and cisplatin on K562 cells*. Bioelectromagnetics, 2014. **35**(6): p. 437-43.
 67. Luo, Y., et al., *Moderate intensity static magnetic fields affect mitotic spindles and increase the antitumor efficacy of 5-FU and Taxol*. Bioelectrochemistry, 2016. **109**: p. 31-40.
 68. Hao, Q., et al., *Effects of a moderate-intensity static magnetic field and adriamycin on K562 cells*. Bioelectromagnetics, 2011. **32**(3): p. 191-9.
 69. Liu, Y., et al., *An investigation into the combined effect of static magnetic fields and different anticancer drugs on K562 cell membranes*. Tumori, 2011. **97**(3): p. 386-92.
 70. Alexiou, C., et al., *Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting*. Cancer Res, 2000. **60**(23): p. 6641-8.
-

-
71. Alexiou, C., et al., *Magnetic drug targeting--biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment*. J Drug Target, 2003. **11**(3): p. 139-49.
 72. Babincova, M., et al., *AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy*. Bioelectrochemistry, 2002. **55**(1-2): p. 17-9.
 73. Dandamudi, S., et al., *External magnet improves antitumor effect of vinblastine and the suppression of metastasis*. Cancer Sci, 2009. **100**(8): p. 1537-43.
 74. Nobuto, H., et al., *Evaluation of systemic chemotherapy with magnetic liposomal doxorubicin and a dipole external electromagnet*. Int J Cancer, 2004. **109**(4): p. 627-35.
 75. Zhang, L., et al., *Moderate and strong static magnetic fields directly affect EGFR kinase domain orientation to inhibit cancer cell proliferation*. Oncotarget, 2016. **7**(27): p. 41527-41539.
 76. Australian Government Department of Health and Ageing Therapeutic Goods Administration, *Australian Public Assessment Report for Cetuximab*. 2010.
 77. Department of Health and Human Services Public Health Service Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research, *Pharmacology/ Toxicology Review STN/BLA Number 125084*. 2003.
 78. Staton, C., C. Lewis, and R. Bicknell, *Angiogenesis assays: a critical appraisal of current techniques*. 2006: John Wiley & Sons.
 79. Götz, A., *Quantitative Mikrozirkulationsanalyse im amelanotischem Hamstermelanom A-Mel-3*. Dissertstion; Ludwig-Maximilians-Universität München, 1987.

-
80. Sewell, I.A., *Studies of the microcirculation using transparent tissue observation chambers inserted in the hamster cheek pouch*. J Anat, 1966. **100**(Pt 4): p. 839-56.
81. Bertram, J.S. and P. Janik, *Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture*. Cancer Lett, 1980. **11**(1): p. 63-73.
82. Strelczyk, D., *Einfluss statischer Magnetfelder auf die Mikrozirkulation in gesundem und malignem Gewebe sowie auf Tumorwachstum und -angiogenese*. 2009.
83. Milas L, M.K., Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J, Fan Z., *In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody*. Clinical Cancer Research, 2000.
84. Wild, R., *Cetuximab preclinical antitumor activity (monotherapy and combination based) is not predicted by relative total or activated epidermal growth factor receptor tumor expression levels*. Molecular Cancer Therapeutics, 2006. **5**(1): p. 104-113.
85. Barnes, C.J., et al., *Insulin-like Growth Factor Receptor as a Therapeutic Target in Head and Neck Cancer*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**(14): p. 4291-4299.
86. Toseland, C.P., *Fluorescent labeling and modification of proteins*. J Chem Biol. **6**(3): p. 85-95.
87. Jung, D., et al., *Chemical biology-based approaches on fluorescent labeling of proteins in live cells*. Mol Biosyst. **9**(5): p. 862-72.
88. Baatz, H., et al., *Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G*. Int J Microcirc Clin Exp, 1995. **15**(2): p. 85-91.
-

-
89. Klyszcz, T., et al., *[Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]*. Biomed Tech (Berl), 1997. **42**(6): p. 168-75.
90. Dellian, M., et al., *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, 1996. **149**(1): p. 59-71.
91. Nolte, D., et al., *Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion?* Int J Microcirc Clin Exp, 1995. **15**(5): p. 244-9.
92. Miller, F.N., et al., *Quantitation of erythrocyte photohemolysis by light microscopy*. Blood Cells, 1991. **17**(3): p. 567-79; discussion 580-4.
93. Saetzler, R.K., et al., *Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes*. J Histochem Cytochem, 1997. **45**(4): p. 505-13.
94. Steinbauer, M., et al., *Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model*. Langenbecks Arch Surg, 2000. **385**(4): p. 290-8.
95. Ang, K.K., *Altered fractionation trials in head and neck cancer*. Semin Radiat Oncol, 1998. **8**(4): p. 230-6.
96. Thames, H.D., Jr., et al., *Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation: implications for dose-survival relationships*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1982. **8**(2): p. 219-26.
97. Lew, W.Z., et al., *Static Magnetic Fields Enhance Dental Pulp Stem Cell Proliferation by Activating The p38 MAPK Pathway as Its Putative Mechanism*. J Tissue Eng Regen Med.
-

-
98. Mhamdi, L., et al., *Effect of a static magnetic field on Escherichia coli adhesion and orientation*. Can J Microbiol. **62**(11): p. 944-952.
 99. Folkman, J., D.M. Long, Jr., and F.F. Becker, *Growth and metastasis of tumor in organ culture*. Cancer, 1963. **16**: p. 453-67.
 100. Weidner, N., et al., *Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma*. N Engl J Med, 1991. **324**(1): p. 1-8.
 101. Jain, R.K., *Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **26**(2-3): p. 71-90.
 102. Zweifach, B.W., *Direct observation of the mesenteric circulation in experimental animals*. Anat Rec, 1954. **120**(1): p. 277-91.
 103. Zweifach, B.W., *The microcirculation in the intestinal mesentery*. Microvasc Res, 1973. **5**(3): p. 363-7.
 104. Intaglietta, M., W.R. Tompkins, and D.R. Richardson, *Velocity measurements in the microvasculature of the cat omentum by on-line method*. Microvasc Res, 1970. **2**(4): p. 462-73.
 105. Prewitt, R.L. and P.C. Johnson, *The effect of oxygen on arteriolar red cell velocity and capillary density in the rat cremaster muscle*. Microvasc Res, 1976. **12**(1): p. 59-70.
 106. Duling, B.R., *The preparation and use of the hamster cheek pouch for studies of the microcirculation*. Microvasc Res, 1973. **5**(3): p. 423-9.
 107. Fiebig, E., K. Ley, and K.E. Arfors, *Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery*. Int J Microcirc Clin Exp, 1991. **10**(2): p. 127-44.
 108. Franke, N. and B. Endrich, *[Effects of halothane and enflurane on the microcirculation]*. Anasth Intensivther Notfallmed, 1983. **18**(6): p. 285-90.
-

-
109. Franke, N., et al., *[The effect of pentobarbital on the microcirculation of skeletal muscles and the subcutis. An animal-experimental study]*. *Anasth Intensivther Notfallmed*, 1982. **17**(1): p. 11-4.
110. Menke, H. and P. Vaupel, *Effect of injectable or inhalational anesthetics and of neuroleptic, neuroleptanalgesic, and sedative agents on tumor blood flow*. *Radiat Res*, 1988. **114**(1): p. 64-76.
111. Zanelli, G.D., P.B. Lucas, and J.F. Fowler, *The effect of anaesthetics on blood perfusion in transplanted mouse tumours*. *Br J Cancer*, 1975. **32**(3): p. 380-90.
112. Okunieff, P., et al., *Effects of pentobarbital anesthesia on the energy metabolism of murine tumors studied by in vivo ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy*. *Radiat Res*, 1988. **115**(2): p. 361-72.
113. Huwer, H., et al., *In vivo analysis of microvascular injury after myocardial cryothermia*. *J Surg Res*, 1998. **79**(1): p. 1-7.
114. Menger, M.D., I. Marzi, and K. Messmer, *In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats*. *Eur Surg Res*, 1991. **23**(3-4): p. 158-69.
115. Barker, J.H., et al., *The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation*. *Plast Reconstr Surg*, 1989. **83**(6): p. 948-59.
116. Eriksson, E., J.V. Boykin, and R.N. Pittman, *Method for in vivo microscopy of the cutaneous microcirculation of the hairless mouse ear*. *Microvasc Res*, 1980. **19**(3): p. 374-9.
117. Sandison, J.C., *A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear*. *The American Record*, 1924. **28**(4): p. 281-287.
118. Sandison, J.C., *The transparent chamber of the rabbit's ear, giving a complete description of improved technic of construction and introduction, and general*
-

-
- account of growth and behavior of living cells and tissues as seen with the microscope.* Developmental Dynamics, 1928. **41**(3): p. 447- 473.
119. Langer, S., et al., *Revascularization of transplanted adipose tissue: a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters.* Ann Plast Surg, 2002. **48**(1): p. 53-9.
120. Vollmar, B., et al., *In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles.* Am J Pathol, 2001. **159**(5): p. 1661-70.
121. Menger, M.D., et al., *A novel technique for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo.* Int J Microcirc Clin Exp, 1990. **9**(1): p. 103-17.
122. Reichel, C.A., et al., *Components of the plasminogen activation system promote engraftment of porous polyethylene biomaterial via common and distinct effects.* PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0116883.
123. Abshagen, K., et al., *In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute NanoBone.* J Biomed Mater Res A, 2009. **91**(2): p. 557-66.
124. Borgstrom, P., I.P. Torres Filho, and B. Hartley-Asp, *Inhibition of angiogenesis and metastases of the Lewis-lung cell carcinoma by the quinoline-3-carboxamide, Linomide.* Anticancer Res, 1995. **15**(3): p. 719-28.
125. Endrich, B., et al., *Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3.* J Natl Cancer Inst, 1982. **68**(3): p. 475-85.
126. Leunig, M., et al., *Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice.* Cancer Res, 1992. **52**(23): p. 6553-60.
-

-
127. Funk, W., B. Endrich, and K. Messmer, *A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants*. Res Exp Med (Berl), 1986. **186**(4): p. 259-70.
128. Messmer, K. and F. Krombach, *[Microcirculation research in experimental surgery]*. Chirurg, 1998. **69**(4): p. 333-8.
129. Endrich, B., et al., *Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters*. Res Exp Med (Berl), 1980. **177**(2): p. 125-34.
130. Asaishi, K., et al., *Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3*. Cancer Res, 1981. **41**(5): p. 1898-904.
131. Shipley, W.U., J.A. Stanley, and G.G. Steel, *Tumor size dependency in the radiation response of the Lewis lung carcinoma*. Cancer Res, 1975. **35**(9): p. 2488-93.
132. Gorelik, E., S. Segal, and M. Feldman, *Growth of a local tumor exerts a specific inhibitory effect on progression of lung metastases*. Int J Cancer, 1978. **21**(5): p. 617-25.
133. de Llobet, L.I., et al., *Simvastatin Enhances the Effects of Radiotherapy and Cetuximab on a Cell Line (FaDu) Derived from a Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck*. Transl Oncol, 2014. **7**(4): p. 513-22.
134. Gehrke, T., et al., *Zinc oxide nanoparticles antagonize the effect of Cetuximab on head and neck squamous cell carcinoma in vitro*. Cancer Biol Ther, 2017: p. 1-6.
135. Hoeben, B.A., et al., *Radiolabeled cetuximab: dose optimization for epidermal growth factor receptor imaging in a head-and-neck squamous cell carcinoma model*. Int J Cancer, 2011. **129**(4): p. 870-8.
136. Santiago, A., et al., *Effect of cetuximab and fractionated irradiation on tumour micro-environment*. Radiother Oncol, 2010. **97**(2): p. 322-9.
-

-
137. Berger, D.P.M., R., *Das rote Buch, Hämatologische und internistische Onkologie*. 6. , überarbeitete und erweiterte Auflage ed. 2017, Landsberg am Lech: ecomed Medizin. 862.
138. Vajkoczy, P., A. Ullrich, and M.D. Menger, *Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation*. *Neoplasia*, 2000. **2**(1-2): p. 53-61.
139. Choy, J.S., O. Mathieu-Costello, and G.S. Kassab, *The effect of fixation and histological preparation on coronary artery dimensions*. *Ann Biomed Eng*, 2005. **33**(8): p. 1027-33.
140. Dobrin, P.B., *Effect of histologic preparation on the cross-sectional area of arterial rings*. *J Surg Res*, 1996. **61**(2): p. 413-5.
141. Menger, M.D. and H.A. Lehr, *Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo*. *Immunol Today*, 1993. **14**(11): p. 519-22.
142. Herrmann, K.S., *Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran*. *Microvasc Res*, 1983. **26**(2): p. 238-49.
143. Miller, F.N., et al., *Differentiation of light-dye effects in the microcirculation*. *Microvasc Res*, 1992. **44**(2): p. 166-84.
144. Reed, M.W. and F.N. Miller, *Importance of light dose in fluorescent microscopy*. *Microvasc Res*, 1988. **36**(1): p. 104-7.
145. Harris, A.G., I. Sinitsina, and K. Messmer, *Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes*. *Eur J Med Res*, 2002. **7**(3): p. 117-24.
146. Dellian, M., et al., *Effects of photodynamic therapy on leucocyte-endothelium interaction: differences between normal and tumour tissue*. *Br J Cancer*, 1995. **72**(5): p. 1125-30.
-

-
147. Leunig, M., et al., *Photodynamic therapy-induced alterations in interstitial fluid pressure, volume and water content of an amelanotic melanoma in the hamster*. Br J Cancer, 1994. **69**(1): p. 101-3.
148. Rovainen, C.M., et al., *Blood flow in single surface arterioles and venules on the mouse somatosensory cortex measured with videomicroscopy, fluorescent dextrans, nonoccluding fluorescent beads, and computer-assisted image analysis*. J Cereb Blood Flow Metab, 1993. **13**(3): p. 359-71.
149. Dvorak, H.F., et al., *Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules*. Am J Pathol, 1988. **133**(1): p. 95-109.
150. Gerlowski, L.E. and R.K. Jain, *Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues*. Microvasc Res, 1986. **31**(3): p. 288-305.
151. Leunig, M., et al., *Evaluation of photodynamic therapy-induced heating of hamster melanoma and its effect on local tumour eradication*. Int J Hyperthermia, 1994. **10**(2): p. 297-306.
152. Zhang, L., et al., *Cell type- and density-dependent effect of 1 T static magnetic field on cell proliferation*. Oncotarget, 2017. **8**(8): p. 13126-13141.
153. Nie, Y., et al., *Low frequency magnetic fields enhance antitumor immune response against mouse H22 hepatocellular carcinoma*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e72411.
154. Ren, J., et al., *LF-MF inhibits iron metabolism and suppresses lung cancer through activation of P53-miR-34a-E2F1/E2F3 pathway*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 749.
155. Ribatti, D., *The Discovery of Tumor Angiogenesis Factors: A Historical Overview*. Methods Mol Biol, 2016. **1464**: p. 1-12.
-

-
156. Wang, J., et al., *Externally Applied Static Magnetic Field Enhances Cardiac Retention and Functional Benefit of Magnetically Iron-Labeled Adipose-Derived Stem Cells in Infarcted Hearts*. *Stem Cells Transl Med*, 2016. **5**(10): p. 1380-1393.
157. Costin, G.E., S.A. Birlea, and D.A. Norris, *Trends in wound repair: cellular and molecular basis of regenerative therapy using electromagnetic fields*. *Curr Mol Med*, 2012. **12**(1): p. 14-26.
158. He, G.L., et al., *The amelioration of phagocytic ability in microglial cells by curcumin through the inhibition of EMF-induced pro-inflammatory responses*. *J Neuroinflammation*, 2014. **11**: p. 49.
159. Mattsson, M.O. and M. Simko, *Is there a relation between extremely low frequency magnetic field exposure, inflammation and neurodegenerative diseases? A review of in vivo and in vitro experimental evidence*. *Toxicology*, 2012. **301**(1-3): p. 1-12.
160. Milovanovich, I.D., et al., *Homogeneous static magnetic field of different orientation induces biological changes in subacutely exposed mice*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016. **23**(2): p. 1584-97.
161. Pena-Philippides, J.C., et al., *Effect of pulsed electromagnetic field (PEMF) on infarct size and inflammation after cerebral ischemia in mice*. *Transl Stroke Res*, 2014. **5**(4): p. 491-500.
162. Vergallo, C., et al., *In vitro analysis of the anti-inflammatory effect of inhomogeneous static magnetic field-exposure on human macrophages and lymphocytes*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e72374.
163. Löffler, G., P.E. Petrides, and P.C. Heinrich, *Biochemie & Pathobiochemie*. 8., völlig neu bearbeitete Auflage ed, ed. G. Löffler, P.E. Petrides, and P.C. Heinrich. 2007: Springer Medizin Verlag Heidelberg. 1141- 1162.
-

-
164. Siegenthaler, W. and H.E. Blum, *Klinische Pathophysiologie*. 9. völlig neu bearbeitete Auflage ed, ed. W. Siegenthaler and H.E. Blum. 2006, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 337.
165. Abramson, N. and B. Melton, *Leukocytosis: basics of clinical assessment*. Am Fam Physician, 2000. **62**(9): p. 2053-60.
166. Zhang, M., et al., *Maspin is an angiogenesis inhibitor*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 196-9.
167. Janeway, C.A., et al., *Immunologie*. Vol. 5. Auflage. 2002, Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag. 607- 619.
168. Hauck, F., et al., *Intrinsic and extrinsic causes of malignancies in patients with primary immunodeficiency disorders*. J Allergy Clin Immunol, 2017.
169. Normanno, N. and W.J. Gullick, *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and bone metastases: different mechanisms of action for a novel therapeutic application?* Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(1): p. 3-6.
170. Bernier, J., *Cetuximab in the treatment of head and neck cancer*. Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(11): p. 1539-52.
171. Dutta, P.R. and A. Maity, *Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy*. Cancer Lett, 2007. **254**(2): p. 165-77.
172. Blick, S.K. and L.J. Scott, *Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer*. Drugs, 2007. **67**(17): p. 2585-607.
173. Dai, W., et al., *Cetuximab inhibits oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis via degradation of epidermal growth factor receptor*. J Oral Pathol Med, 2015. **43**(4): p. 250-7.
-

-
174. Chu, C., et al., *Cetuximab directly inhibits P-glycoprotein function in vitro independently of EGFR binding*. Eur J Pharm Sci, 2015. **76**: p. 18-26.
175. Marzi, L., et al., *FOXO3a and the MAPK p38 are activated by cetuximab to induce cell death and inhibit cell proliferation and their expression predicts cetuximab efficacy in colorectal cancer*. Br J Cancer, 2016. **115**(10): p. 1223-1233.
176. Smith, T.A. and R.W. Cheyne, *Predicting tumour response to anti-HER1 therapy using medical imaging: a literature review and in vitro study of [18F]-FDG incorporation by breast cancer cells responding to cetuximab*. Br J Biomed Sci, 2011. **68**(3): p. 158-66.
177. Vincenzi, B., et al., *Cetuximab: from bench to bedside*. Curr Cancer Drug Targets, 2010. **10**(1): p. 80-95.
178. Granados-Garcia, M., et al., *Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: The Current Role of Cetuximab*. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2016. **78**(6): p. 320-333.
179. Vincenzi, B., et al., *Early magnesium reduction in advanced colorectal cancer patients treated with cetuximab plus irinotecan as predictive factor of efficacy and outcome*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(13): p. 4219-24.
180. Tunik, S., et al., *The subconjunctival use of cetuximab and bevacizumab in inhibition of corneal angiogenesis*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012. **250**(8): p. 1161-7.
181. Kurai, J., et al., *Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(5): p. 1552-61.
182. Naramura, M., et al., *Therapeutic potential of chimeric and murine anti-(epidermal growth factor receptor) antibodies in a metastasis model for human melanoma*. Cancer Immunol Immunother, 1993. **37**(5): p. 343-9.
-

-
183. Wang, L., et al., *GEM-loaded magnetic albumin nanospheres modified with cetuximab for simultaneous targeting, magnetic resonance imaging, and double-targeted thermochemotherapy of pancreatic cancer cells*. Int J Nanomedicine, 2015. **10**: p. 2507-19.
184. Bruns, C.J., et al., *Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1936-48.
185. Herbst, R.S., E.S. Kim, and P.M. Harari, *IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, for treatment of head and neck cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2001. **1**(4): p. 719-32.
186. Vincenzi, B., et al., *Angiogenesis modifications related with cetuximab plus irinotecan as anticancer treatment in advanced colorectal cancer patients*. Ann Oncol, 2006. **17**(5): p. 835-41.
187. Wang, W.M., et al., *Epidermal growth factor receptor inhibition reduces angiogenesis via hypoxia-inducible factor-1alpha and Notch1 in head neck squamous cell carcinoma*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0119723.
188. Goldstein, N.I., et al., *Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(11): p. 1311-8.
189. Böcker, W., et al., *Pathologie*. 5. Auflage ed, ed. W. Böcker, et al. 2012: Urban & Fischer Verlag. 123- 170.
190. Griffioen, A.W., S.C. Tromp, and H.F. Hillen, *Angiogenesis modulates the tumour immune response*. Int J Exp Pathol, 1998. **79**(6): p. 363-8.
-

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: nach A. Götz [77]: Skizze eines Rückenhautkammerrahmens	15
Abbildung 2: nach A. Götz [77]: Schematische Darstellung der Rückenhautkammerpräparation	16
Abbildung 3: C57/Bl6-Maus nach Kammerimplantation	17
Abbildung 4: nach G. Brix [43, 77]: Schematische Darstellung des Versuchsplatzes	21
Abbildung 5: LLC-1 am 9. Tag nach Inokulation.....	27
Abbildung 6: CapImage-Auswertung	28
Abbildung 7: Zeitstrahl zu den Untersuchungen an immunkompetenten Tieren	33
Abbildung 8: Zeitstrahl zu den Untersuchungen an immundefizienten Tieren:	34
Abbildung 9: Entwicklung des Körpergewichts.....	37
Abbildung 10: Tumorfläche (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF)	39
Abbildung 11: Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF).....	40
Abbildung 12: Gefäßdurchmesser der Tumorblutgefäße (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF).....	41
Abbildung 13: Funktionelle Gefäßdichte der Tumoren (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF) ..	42
Abbildung 14: Leukozytenflux in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF)	43
Abbildung 15: Leukozytenrolling-Fraction in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, 2hSMF und 35minSMF).....	44
Abbildung 16: Leukozytenadhärenz in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF)	45
Abbildung 17: Tumorfläche (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab)	47
Abbildung 18: Tumorfläche (Kontrolle, 2hSMF, 35minSMF, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab)	48
Abbildung 19: Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab).....	49

Abbildung 20: Gefäßdurchmesser der Tumorblutgefäße (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab)	50
Abbildung 21: Funktionelle Gefäßdichte in den Tumoren (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab)	51
Abbildung 22: Leukozytenflux in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab)	52
Abbildung 23: Leukozytenrolling-Fraction in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab).....	53
Abbildung 24: Leukozytenadhärenz in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle, Cetuximab, 2hSMF+Cetuximab, 35minSMF+Cetuximab)	54
Abbildung 25: Tumorfläche (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS und CetuximabIS).....	55
Abbildung 26: Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS).....	56
Abbildung 27: Gefäßdurchmesser der Tumorblutgefäße (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS)	57
Abbildung 28: Funktionelle Gefäßdichte der Tumoren (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS)	58
Abbildung 29: Leukozytenflux in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS)	59
Abbildung 30: Leukozytenrolling- Fraction in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS).....	60
Abbildung 31: Leukozytenadhärenz in den Tumorblutgefäßen (Kontrolle; Cetuximab; KontrolleIS; CetuximabIS)	61

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Wellenlängenbereiche der verwendeten Anregungsfilter, Teilerspigel und Sperrfilter.....	24
---	-----------

10. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Betreuung von Prof. Dr. Alexander Berghaus, Prof. Sebastian Strieth und Dr. Donata Gellrich durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen, ohne deren Hilfe die vorliegende Arbeit nicht zu einem erfolgreichen Abschluss gekommen wäre:

Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl danke ich für die freundliche Aufnahme am Walter-Brendel Zentrum und den damit verbundenen Zugang zur experimentellen Forschung und zum anspruchsvollen, wissenschaftlichen Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Alexander Berghaus und Herrn Prof. Dr. Sebastian Strieth für die Überlassung dieses interessanten Themas und für das in mich gesetzte Vertrauen.

Bei Frau Dr. Donata Gellrich möchte ich mich ganz besonders für die hervorragende Betreuung und die unermüdliche Unterstützung bedanken. Durch ihr Engagement und ihre fachliche Kompetenz konnte ich die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens und Denkens von der sorgfältigen Versuchsplanung über die gewissenhafte Durchführung der Experimente und deren Auswertung bis hin zur kritischen Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse erlernen. Ihre Ratschläge haben mich weit über die Belange dieser Arbeit hinaus unterstützt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann verdanke ich die wertvolle wissenschaftliche Erfahrung des Promotionstudienganges zur Förderung von Forschung und Lehre.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. Timon Hussain und Frau Dr. Siiri Lüdemann, die mir bei der Erlernung der Methodik stets beratend und helfend zur Seite standen. Gleiches gilt für Herrn Prof. Dr. Martin Canis, Herrn PD Dr. Fritz Ihler, Herrn Dr. Mattis Bertlich und Herrn Maximilian Hessenauer sowie allen Mitarbeitern und Doktoranden des Walter-Brendel-

Zentrums, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und zu einem freundschaftlichen und kollegialen Miteinander beitrugen.

Mit der Bereitstellung des Magneten legte Herr Prof. Dr. Gunnar Brix die Grundlage für die Untersuchungen der Magnetfeldstudien, wofür ich ihm herzlich danken möchte.

Meinen Eltern, meinen drei Schwestern und meinem Neffen Jonas gilt mein gesonderter Dank für die immerwährende Unterstützung, welche mich nicht nur während meines Studiums und der Durchführung und Vollendung meiner Dissertation begleitet hat. Des Weiteren danke ich meinen Studienfreunden Herrn Dr. Constantin Weber und Herrn Dipl.-Math. Deniz Atug für die Mitberatung bei statistischen Fragen.

11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die therapeutische Nutzbarkeit von statischen Magnetfeldern bei EGFR-überexprimierenden Plattenepithelkarzinomen *in vivo*

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

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

Isernhagen, den 09.07.2018

Ort, Datum

Ursula Schmidtmayer

Unterschrift Doktorand