

Aus der Klinik für Urologie
(Prof. Dr. med. L. Trojan)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Wirkung des kompetitiven Gastrin-releasing peptide-
(GRP-) -Antagonisten RC 3095 auf das Wachstumsverhalten
im Modell experimentell induzierter orthotoper Nierenzellkar-
zinome – Analyse mittels Volumencomputertomographie
(VCT)**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen
vorgelegt von

Nikolaos Koskinas

aus

Korfu, Griechenland

Göttingen 2015

Dekan : Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter : Prof. Dr. med. R.-H. Ringert

II. Berichterstatterin : Prof. Dr. Frauke Alves

III. Berichterstatter : PD Dr. Dr. Albrecht Neeße

Tag der mündlichen Prüfung : 18.10.2017

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
Verzeichnis der Abkürzungen.....	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms.....	9
1.2 Histologische Typen des Nierenzellkarzinoms	14
1.3 Therapiemöglichkeiten des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms	15
1.4 Therapiemöglichkeiten des metastasierten Nierenzellkarzinoms.....	16
1.4.1 Nephrektomie	16
1.4.2 Zytokintherapien	17
1.4.3 Antikörpertherapie.....	17
1.4.4 Tyrosinkinasehemmer.....	18
1.4.5 Selektive Hemmung des m-TOR-Signalwegs	19
1.5 Bombesinähnliche Peptide.....	20
1.5.1 <i>Gastrin Releasing Peptide</i> (GRP) – Nicht-onkologische Bedeutung.....	21
1.5.2 Die Bedeutung von <i>Gastrin Releasing Peptide</i> für die Tumorprogression.....	21
1.6 Modelle zur Beobachtung von Tumorwachstum <i>in vivo</i>	23
1.6.1 Histologie	23
1.6.2 Intravitalmikroskopie	23
1.6.3 Die Rolle der Flachdetektor-Volumen-Computertomographie (fpVCT) in der Untersuchung der Progression von Tumoren in Kleintieren.....	24
1.7 Zielsetzung und Aufgabenstellung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Versuchsgruppen	26
2.2 Versuchstiere	26
2.3 Materialien	27

2.4 Methoden	29
2.4.1 Vorbereitung und Narkose	29
2.4.2 Operation	29
2.4.3 Postoperative Behandlung.....	33
2.4.4 Durchführung der fpVCT	35
2.4.5 Tötung der Mäuse und Sektion	37
2.4.6 Pathohistologie	37
2.4.7 Morphometrie.....	38
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Tierexperimentelle Daten	39
3.2 Volumetomographie	40
3.3 Pathohistologie.....	47
3.4 Morphometrie	49
4 Diskussion	52
5 Zusammenfassung	61
6 Literaturverzeichnis	62

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	TNM-Klassifikation der Nierenzellkarzinome (UICC 2009)	10
Tabelle 1.2	Nukleäres Grading des NZK nach Thoenes 1986	11
Tabelle 1.3	Darstellung der Robson-Klassifikation (1969) des NZK	11
Tabelle 1.4	Zusammensetzung des Störkel-Summscores (1990)	12
Tabelle 1.5	Metastasierungsmuster aus Autopsiedaten (1999)	13
Tabelle 2.1	Materialien	27
Tabelle 2.2	Materialien	28
Tabelle 2.3	Materialien	28
Tabelle 2.4	Abbruchkriterien	34
Tabelle 3.1	Übersichtstabelle unbehandelter und behandelter Tiere	39
Tabelle 3.2	VCT Gruppe 1	44
Tabelle 3.3	VCT Gruppe 2	45
Tabelle 3.4	Morphometrie Gruppe 1	50
Tabelle 3.5	Morphometrie Gruppe 2	51
Abbildung 2.1	Männliche athymische haarlose Mäuse	26
Abbildung 2.2	Rückenlagerung und steriles Abwaschen	30
Abbildung 2.3	Eröffnen des Peritoneums	31
Abbildung 2.4	Stumpfe Nierenfreilegung	31
Abbildung 2.5	Tumorzelleninjektion in den linken Unterpole	32
Abbildung 2.6	Formierung einer gut sichtbaren, flüssigkeitsgefüllten Blase	32
Abbildung 2.7	Postoperative Erholung auf der Wärmeplatte	33
Abbildung 2.8	Subkutane Injektion des GRP-Antagonisten	34
Abbildung 2.9	Das fpVCT unserer Abteilung für Radiologie	35
Abbildung 3.1	Normaler Nierenbefund bei der VCT	40
Abbildung 3.2	3D Rekonstruktion normaler Nieren	41
Abbildung 3.3	Großer Nierentumor bei der VCT (Maus 7, Gruppe 1)	41
Abbildung 3.4	Ausmessen des Nierentumors bei der VCT	42
Abbildung 3.5	Bestimmung des Tumorumens	42
Abbildung 3.6	Volumetrie des Tumors	43
Abbildung 3.7	Volumetrie Nierentumor links	43
Abbildung 3.8	Hepatische Metastasen	44
Abbildung 3.9	Histologie der Niere und des orthotopen Nierentumors	47

Abbildung 3.10 Histologie der Leber- und Lungenmetastasen des Nierentumors...	48
Abbildung 3.11 Makrophoto des Präparates zur Morphometrie	49
Diagramm 3.1 Tumorumina (Gruppe 1 und 2)	46

Verzeichnis der Abkürzungen

AKT	(=PKB) Protein Kinase B
c-KIT	Mast-Stem Cell Growth Factor Receptor (SCFR) oder Tyrosine-protein Kinase KIT oder CD117
CD8(+)	suppressor cells, T-zytotoxische Zellen 8
CT	Computertomographie
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
EAU	European Association of Urology
EGF	Epidermal Growth Factor
FKBP-12	12-kDa FK506-Binding Protein
FLT-3	Fetal Liver Tyrosine Kinase 3
fpVCT	flat panel Volumetric Computed Tomography
GIP	Gastric Inhibitory Peptide oder Glucose-dependent Insulinotropic Peptide
GRP	Gastrin Releasing Peptide
GRP-R	Gastrin Releasing Peptide Receptor
HIF	Hypoxia Inducible Factors
IFN- α	Interferon alpha
IL-2	Interleukin 2
MD-CT	Multidetector-Computertomographie
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
m-TOR	mammalian Target Of Rapamycin
NZK	Nierenzellkarzinom
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PP	Pankreatisches Polypeptid
RaF	Rapidly accelerated Fibrosarcoma

Stat3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TGF- α	Transforming Growth Factor α
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TNM	Tumor, lymph Nodes, Metastasis
UICC	Union for International Cancer Control
VCT	Volumetric Computed Tomography
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
ZNS	Zentralnervensystem
5-FU	5 Fluorouracil

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms

Nierenzellkarzinome (NZK) sind Tumoren des Nierenparenchyms und die häufigsten bösartigen Tumoren der Nieren. Es sind die dritthäufigsten Tumoren im urologischen Fachgebiet nach den Krebserkrankungen der Prostata und der Harnblase.

Die Inzidenz variiert sehr stark zwischen Europa, Nord-Amerika, Asien und Süd-Amerika. Auch innerhalb Europas variiert die Inzidenz und beträgt 2,9 pro 100.000 (Männer) / 1,5 pro 100.000 (Frauen) in Serbien und 15,2 pro 100.000 (Männer) / 7,2 pro 100.000 (Frauen) in Tschechien. In der Bundesrepublik Deutschland liegt die Inzidenz mit 9,7 pro 100.000 (Männer) und 4,4 pro 100.000 (Frauen) zwischen den vorgenannten Zahlen. Männer erkranken 1,8 - 3,4 Mal häufiger als Frauen (Chow et al. 2010).

Die Ursache der Entstehung des Nierenzellkarzinoms ist unklar. Während das klarzellige und das chromophile Nierenzellkarzinom dem proximalen Tubulusepithel entstammen, leiten sich das chromophobe Nierenzellkarzinom, das Ductus-Bellini-Karzinom wie auch das benigne Onkozytom vom Sammelrohrsystem her (Störkel et al. 1997, Sunela et al. 2014, Thoenes et al. 1990 a und b).

Die Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms erfolgt heute nach der Einteilung der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) in der Fassung aus dem Jahre 2009 (Ljungberg et al. 2014).

TNM-Klassifikation der Nierenzellkarzinome nach UICC 2009

T1	Tumor begrenzt auf die Niere und ≤ 7 cm
T1a	Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T1b	Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung
T2a	Tumor begrenzt auf die Niere und 7-10 cm
T2b	Tumor begrenzt auf die Niere aber >10 cm
T3	Tumor infiltriert das umliegende Gewebe nicht über die <u>Gerota-Faszie</u>
T3a	Tumor infiltriert die Nebenniere oder das perirenale Gewebe
T3b	Tumor infiltriert die Nierenvene oder die <u>Vena cava inferior</u> bis unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor infiltriert die Vena cava inferior oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus
N0	Keine <u>Lymphknotenmetastasen</u>
N1	Metastasen in einem Lymphknoten (< 2 cm)
N2	Metastasen in mehr als einem Lymphknoten (> 2 cm bis 5 cm)
N3	Metastasen in mehr als einem Lymphknoten (> 5 cm)
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1.1

Im Störkel-Score (Störkel et al.1990) ist das 3-stufige nukleäre Grading nach Thoenes (Thoenes et al. 1986 a und b) enthalten. Darüber hinaus integriert der Score den histologischen Zelltyp, das Wachstumsmuster des Nierenzellkarzinoms, die besonders im angloamerikanischen Sprachraum verbreitete Tumorklassifikation nach Robson (Robson et al.1969) und das Patientenalter zum Operationszeitpunkt. Durch die Zusammenfassung dieser Einzelkomponenten und unterschiedliche Gewichtung ergibt sich ein Summenscore, der zur Einordnung des Patienten in eine von drei möglichen Prognosegruppen - *gut, mittel, schlecht* - führt:

Nukleäres Grading des NZK nach Thoenes (1986b)			
Grading	Kerne	Nukleolen	Mitosen
1	Regelmäßig, rund, in der Größe normaler Tubuluszellkerne	Nicht vergrößert	Fast keine
2	Im Vergleich zu normalen Tubuluszellkernen vergrößert, mäßige Form- und Größenunterschiede	Mäßig vergrößert	Gelegentlich
3	Beträchtlich vergrößert, ausgeprägte Polymorphie und Hyperchromasie	Zum Teil stark vergrößert, oft Riesenzellen	Oft atypisch

Tabelle 1.2

Darstellung der Robson-Klassifikation (1969) des NZK	
Stadium	Definition
1	Tumor auf die Niere beschränkt
2	Tumor infiltriert perirenales Fettgewebe
3	Tumor infiltriert makroskopisch in V. renalis oder V. cava \pm Lymphknotenmetastasen
4	Tumor infiltriert Nachbarorgane (außer Nebenniere) oder Nachweis von Fernmetastasen

Tabelle 1.3

Zusammensetzung des Störkel-Summenscores (1990) und Verteilung der einzelnen Gruppen		
Parameter	Graduierung	Punktwert
Robson-Stadium	1	1
	2	2
	3	4
	4	6
Grading nach Thoenes	1	1
	2	3
	3	5

Zelltyp	Klarzellig	2
	Chromophil	1
	Chromophob	1
	Spindelzellig/pleomorph	2
Wachstumsmuster	Kompakt	2
	Tubulopapillär	1
	(Tubulo)zystisch	1
Patientenalter (Jahre)	<30 Jahre	1
	30-40 Jahre	2
	41-50 Jahre	1
	51-60 Jahre	2
	61-70 Jahre	2
	>70 Jahre	1
Summenscore	Gute Prognose	5-9
	Intermediäre Prognose	10-14
	Schlechte Prognose	15-17

Tabelle 1.4

Die Ultraschalluntersuchung (Sonographie) hat in der Beurteilung der Nieren eine zentrale Bedeutung und ist die klinische Untersuchung der ersten Wahl. Nierenzelltumoren ab einer Größe von 2,5 cm können durch eine Ultraschalluntersuchung mit hoher Sicherheit entdeckt werden (Kang und Chandarana 2012). Die weitere diagnostische Bildgebung bei Patienten mit Nierentumoren erfolgt mittels Schnittbildverfahren, wobei die Multidetector-Computertomographie (MD-CT) der Magnetresonanztomographie (MRT) beim lokalen Staging als gleichwertig anzusehen ist. Das Fernmetastasen-Staging ist eine Domäne der CT, während die MRT eine verbesserte Charakterisierung komplexer Läsionen ermöglicht (Ljungberg et al. 2014, Mourad et al. 2014).

Das Tumorstadium kann korrekt erst nach der Operation durch die makro- und mikroskopische pathologische Untersuchung (= pT-Stadium) beurteilt werden. Lokal-begrenzte Tumoren sind T1-T2 Tumoren, lokal-fortgeschrittene Tumoren sind T3-T4 Tumoren. Absiedlungen des Nierenzellkarzinoms in die hilären Lymphknoten betrachtet man als regionale Metastasen, diejenigen

über den Blutweg in Lunge, Skelett, Gehirn und Leber werden klinisch als fernmetastasiertes Nierenzellkarzinom zusammengefasst.

Zum Zeitpunkt der Detektion des Nierenzellkarzinoms sind ca. 40% der Patienten in einem lokalisierten Stadium, ca. 30% in einem scheinbar lokalisierten Stadium (zum Zeitpunkt der Diagnosestellung können keine Metastasen festgestellt werden, allerdings ist mit dem Auftreten von sogenannten Spätmetastasen zu rechnen) und weitere ca. 30% weisen bereits bei der Primärdiagnose eine Metastasierung auf (Thrasher und Paulson 1993, Chan und Marshall 1998, Ljungberg et al. 2007 und 2014).

Metastasierungsprädisposition:

Aus Autopsiedaten (Bichler und Wechsel 1999) ergeben sich folgende Metastasierungsmuster:

- Lunge	55%	- Lymphknoten	34%
- Knochen	32%	-ZNS	5,7%
- Kontralaterale Niere	11%	-Herz	5%
- Leber	33%	-Nebennieren	17%

Tabelle 1.5

Das Nierenzellkarzinom (NZK) zeichnet sich im lokalisierten Stadium durch eine gute Operabilität mit guten 5-Jahres-Überlebensraten aus. Problematisch sind bereits metastasierte NZK und solche, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung noch nicht als metastasiert erscheinen, bei denen in der Folgezeit jedoch Metastasen auftreten. Für diese fortgeschrittenen Karzinome gibt es bisher keine kurative Therapie (Bichler und Wechsel 1999, Motzer et al. 1999). Mit der Einführung immunchemotherapeutischer Kombinationsbehandlungen (siehe unter 1.4.2) (Atzpodien et al. 2001) werden erste Erfolge der palliativen Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms berichtet. Heute können Multikinasehemmer und Medikamente, die insbesondere eine Hemmung der Neoangiogenese bewirken, das Wachstum der Metastasen negativ beeinflussen und für ein Überleben bei Persistenz von Tumor für eine gewisse Zeit sorgen (siehe unter 1.4.2-1.4.4). (Coppin et al. 2011, Escudier et al. 2007 a und b, 2013).

1.2 Histologische Typen des Nierenzellkarzinoms

Die histopathologische Klassifikation des Nierenzellkarzinoms basiert wesentlich auf den Arbeiten von Thoenes et al., die Ende der 80er Jahre die sogenannte „Mainz-Klassifikation“ inaugurierten und in der Folge weiter entwickelt haben. Den einzelnen Subtypen des Nierenzellkarzinoms können heute als Entstehungsort verschiedene Abschnitte des Tubulusepithels zugeordnet werden. Das Ziel einer histopathologischen Klassifikation ist anhand morphologischer Kriterien biologisch unterschiedliche Entitäten zu erfassen, um so letztendlich eine individuelle prognostische Aussage zu ermöglichen. Tumorentstehung und Tumorprogression sind eng an genetische Alterationen geknüpft, sodass mit zunehmendem Kenntnisstand hinsichtlich genetischer Veränderungen beim Nierenzellkarzinom bzw. dessen Subtypen eine zytopathologische Klassifikation und eine molekulargenetische Klassifikation existieren (Ljungberg et al. 2014, Pradhan et al. 2009, Thoenes und Störkel 1991). Die histopathologische Einteilung anhand der Mainz-Klassifikation erfolgt nach 3 Kriterien:

1. Tumorzelltyp,
2. Wachstumsmuster,
3. zytologisches Grading.

Thoenes und Kollegen (Thoenes et al. 1986b) unterscheiden nach diesen Kriterien 8 Subtypen des Nierenzellkarzinoms:

1. klarzelliges Nierenzellkarzinom,
2. chromophiles Nierenzellkarzinom,
3. chromophobes Nierenzellkarzinom,
4. Ductus-Bellini-Karzinom,
5. Transitionalzelltyp,
6. neuroendokrines Nierenzellkarzinom,
7. onkozytäres Adenom (Onkozytom),
8. metanephrogenes Adenom.

Das klarzellige Nierenkarzinom ist mit einem Anteil von 70–76% der Fälle die häufigste Variante. Die Zellen zeichnen sich durch ein wasserklares Zytoplasma aus, die Zellkerne liegen zentral oder exzentrisch, die Zellgrenzen sind scharf abgrenzbar.

Das chromophile Nierenzellkarzinom ist mit einem Anteil von 10% der zweithäufigste Tumortyp. Es werden 2 Zelltypen unterschieden, ein basophil-kleinzelliger und ein eosinophiler Typ, wobei Übergänge (*duophil*) vorkommen können.

Das chromophobe Nierenzellkarzinom wird in 5% der Fälle nachgewiesen.

Nierenzellkarzinome, ausgehend vom Sammelrohrsystem (Ductus-Bellini-Karzinome), sind makroskopisch im Nierenmark lokalisiert, sehr selten (<1%) und hochaggressive Tumore.

Eine Sonderstellung nimmt das Onkozytom ein (bis 4% der Tumoren). Es metastasiert nicht und hat eine gute Prognose. Vielfach wird es daher unter den gutartigen (benignen) Nierentumoren eingeordnet.

Die verbleibenden Typen (Transitionalzelltyp, neuroendokrines Karzinom) sind extrem selten und haben eine sehr geringe klinische Bedeutung.

1.3 Therapiemöglichkeiten des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms

Die radikale Nephrektomie, erstbeschrieben von Robson et al. im Jahr 1969, galt lange als Standardtherapie bei Patienten mit unilateralem Nierentumor und gesunder kontralateraler Niere. Aufgrund der fortschreitenden Entwicklung bildgebender Verfahren können heutzutage zunehmend mehr Nierenzellkarzinome auch in früheren Stadien detektiert werden. Der Anteil an diagnostizierten asymptomatischen Tumoren steigt auf nahezu

80% an (Kato et al. 2004, Pattard et al. 2002, Kang et al. 2012). Bei imperativer Indikation zum Organerhalt (= anatomische oder funktionelle Einzelniere, präterminale Niereninsuffizienz oder bilateraler Tumorbefall) hat sich die parenchymerhaltende Tumorchirurgie schon längere Zeit als Standard durchgesetzt, um den Patienten vor der Dialysepflicht zu bewahren. Beginnend in den Jahren von 1980-1990 weisen Daten darauf hin, dass auch bei gesunder kontralateraler Niere der Nierenerhalt zu einem Überlebensvorteil führt (Steinbach et al. 1995). Aufgrund der guten Erfahrung mit der organerhaltenden Tumorchirurgie der Niere, den niedrigen Komplikationsraten, der exzellenten lokalen Tumorkontrolle und den guten onkologischen Langzeitergebnissen hat sich die organerhaltende Nierentumorchirurgie als Alternative zu der radikalen Nephrektomie bei kleinen unilateralen Nierentumoren mit gesunder Gegenniere (elektive Indikation) erwiesen (Mourad et al. 2014, Roos et al. 2014). Auch in den aktuellen Leitlinien der europäischen Gesellschaft für Urologie (EAU Ljungberg et al. 2007 und 2014) ist die offene Nierenteilresektion als Standard in der Behandlung von pT1a-Nierentumoren aufgenommen worden und hat somit die klassische Nephrektomie für diese Indikation verdrängt (Ljungberg et al. 2007). Es werden nach Nierenteilresektion tumorspezifische 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 89% und 98% erreicht, ähnlich wie nach radikaler Nephrektomie (Lane et al. 2007). Abhängig ist die parenchymerhaltende Nierentumoroperation aber auch von der Größe des Tumors, seiner Lage im Verhältnis zum Gesamtorgan und der Möglichkeit, den Nierentumor „im Gesunden“ aus der verbleibenden Niere zu entfernen.

1.4 Therapiemöglichkeiten des metastasierten Nierenzellkarzinoms

1.4.1 Nephrektomie

Die weitgehende Unbeeinflussbarkeit des metastasierten Nierenzellkarzinoms durch zytostatische Chemotherapie führte zu der Frage, ob es

überhaupt sinnvoll sei, metastasierte Patienten einer Entfernung des Primärtumors zuzuführen. Zwei randomisierte Studien, eine in Europa (EORTC GU) und eine in den USA (SWOG) haben einen kleinen, aber signifikanten Vorteil einer zytoreduktiven Nephrektomie plus Zytokintherapie versus einer alleinigen Zytokintherapie ergeben (Flanigan et al. 2004). Diese Ergebnisse führten einerseits zur Akzeptanz der Tumornephrektomie bei metastasiertem Nierenzellkarzinom (Russo 2010) und andererseits zur Untersuchung von Prognosefaktoren, um nur die Patienten, die aller Voraussicht nach profitieren, der Belastung der Operation zu unterwerfen (Motzer et al. 1999 – MSKCC - Kriterien).

1.4.2 Zytokintherapien

IL-2 und/oder alpha-IFN, häufig in Kombination mit 5-FU

Die am besten untersuchte und vor dem Jahrhundertwechsel in Europa verbreitete Therapie beinhaltet die Gabe von Interleukin-2 (subkutan), alpha-Interferon (subkutan) und 5-Fluorouracil (i.v.), sog. Hannover- oder Atzpodien-Schema (Atzpodien et al. 2001). Als Ansprechraten sind zwischen 20 und 40% veröffentlicht worden; signifikante Verlängerungen der Überlebenszeiten von 12 bis 17,5 Monaten sind beschrieben worden und sind insbesondere bei den Patienten möglich geworden, die bei gutem Allgemeinzustand und metachroner, insbesondere pulmonaler Metastasierung auf die Therapie primär angesprochen haben. Nicht in allen Folgestudien sind diese günstigen Ergebnisse reproduziert worden. Diese Tatsache und die Rate der schwerwiegenden Nebenwirkungen insbesondere der Interleukin-2- Administration haben in der Folgezeit dazu geführt, diese Therapie weitgehend zu verlassen.

1.4.3 Antikörpertherapie

Bevacizumab (Avastin®) ist ein monoklonales Immunglobulin G1-Antikörper und bindet am Gefäßwachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*), der die Bildung von Blutgefäßen im Tumor stimuliert. In der Folge wird dem Tumor die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen entzogen. Die bis-

herigen Studien beim Nierenzellkarzinom sind vielversprechend, insbesondere in Kombination mit IFN- α als 1. Linie Therapie bei Patienten mit guter Prognose (Escudier et al. 2007b). Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom ohne vorhergehende Systemtherapie, aber vorhergehender Nephrektomie oder Nierenteilresektion aller MSKCC - Risikogruppen (Motzer et al. 1999), wurden randomisiert mit Bevacizumab plus IFN- α versus IFN- α allein und behandelt. Bei Patienten mit guter Prognose zeigte sich ein signifikanter Unterschied im progressionsfreien Überleben (12,9 Monate für Bevacizumab plus IFN- α und 7,6 für IFN- α). Bei Patienten mit schlechter Prognose lag das progressionsfreie Überleben bei 2,2 Monaten für Bevacizumab plus IFN- α und 2,1 Monaten für IFN- α allein. Auf dieser Studie fußt die Zulassung der Therapie mit Bevacizumab/IFN- α als 1. Linie Therapie bei Patienten mit guter Prognose.

1.4.4 Tyrosinkinasehemmer

Sunitinib (Sutent[®]) ist nach Abschluss einer Phase-III-Studie für die *first-line* Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinom seit 9 Jahren zugelassen (Motzer et al. 2007a). Bei dieser Substanz handelt es sich um ein *small molecule*, welches den VEGF - Rezeptor durch Hemmung der Tyrosinkinase, die für die Aktivierung der Signalkaskade essentiell ist, ausschaltet. Über den gleichen Mechanismus werden außerdem noch die PDGF - Rezeptoren, C-KIT und FLT-3 inhibiert. Es hat den Vorteil, oral verabreicht werden zu können. Motzer et al. konnten in zwei früheren Studien die Wirksamkeit von Sunitinib beim metastasierten Nierenzellkarzinom zeigen. In der ersten Studie zeigten 25 der 63 Patienten, die an therapieresistentem metastasierten Nierenkrebs erkrankt waren, eine Teilremission und weitere 18 Pat. eine Stabilisierung ihrer Krankheit. Die Zeit bis zur Progression der Erkrankung betrug im Mittel 8,7 Monate und das mediane Überleben 16,4 Monate (Motzer et al. 2006). Im Rahmen der zweiten Studie, in der 106 Patienten mit therapieresistentem, metastasierten Nierenkrebs untersucht wurden, konnten die Ansprechraten bestätigt werden. Die Therapie mit Sutent wurde von den Patienten in beiden Studien insgesamt akzeptabel toleriert (Motzer et al. 2007b).

Sorafenib (Nexavar®) ist ein raf-Kinase- und VEGFR-Hemmer, der das Tumorstromwachstum durch zwei dem Krebs entgegenwirkende Mechanismen verhindern soll: Er hemmt die Proliferation der Tumorzellen und gleichzeitig die Angiogenese des Tumors (Escudier et al. 2007a). Eine wichtige Rolle hat die Studie von Escudier et al. 2009 gespielt, in der 189 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom aller MSKCC Risikogruppen ohne vorhergehende Systemtherapie in zwei Gruppen randomisiert wurden. Die erste erhielt 800 mg Sorafenib täglich. Die zweite bekam 9 Mio iU IFN- α 3x/wöchentlich. In dieser ersten Behandlungsphase zeigte sich kein Unterschied im Ansprechen zwischen IFN- α und Sorafenib, wobei die Lebensqualität besser und das Auftreten einer Symptomatologie unter Sorafenib seltener war. Bei Progression der Erkrankung traten die Patienten in eine zweite Behandlungsphase ein. Hier zeigte sich eine Reduktion der Tumoren bei 43 Patienten, in der Interferongruppe bewirkte der Wechsel zu 800 mg Sorafenib eine Tumorreduktion bei 38 von 50 Patienten.

Pazopanib(Votrient®) wird wie Sunitinib und Sorafenib ebenfalls oral verabreicht und ist der jüngste zugelassene Vertreter der Tyrosinkinasehemmer. Indikationen sind die Erstlinientherapie bei geringem oder intermediärem Risiko. Möglicherweise hat diese Substanz ein etwas besseres Nebenwirkungsprofil als die beiden anderen Tyrosinkinasehemmer (DiLorenzo et al. 2011, Coppin et al. 2011)

1.4.5 Selektive Hemmung des m-TOR-Signalwegs

Rapamycin (= Sirolimus) ist als Antimycotikum in den 1970er Jahren entdeckt worden und führte zur Entdeckung des mTOR.

Die Abkürzung „mTOR“ steht für *mammalian target of rapamycin*. Analoga für das Rapamycin sind das intravenös anzuwendende Temsirolimus (Torisel®) und das oral anwendbare Everolimus (Certican®) (= „Rapaloge“).

Die Arzneistoffe binden an ein intrazelluläres Protein FKBP-12 und bilden einen Komplex, der wiederum mTOR blockiert. In der Folge wird der Zellzyklus in der G1-Phase gestoppt. Zusätzlich zur Regulation der Zellzyklusproteine kann mTOR die Bildung von Transkriptionsfaktoren (HIF) steuern, die die Zel-

le befähigen, sich an ein hypoxisches Milieu anzupassen und den angiogenen Faktor VEGF zu produzieren. Temsirolimus(Torisel[®]) / Everolimus(Certican[®]) sind selektive Hemmstoffe des mTOR-Signalwegs, der in Krebszellen oft überaktiviert ist. Die an diesem Signalweg beteiligte Kinase ist maßgeblich für den intrazellulären PI3K-AKT-mTOR-Signalweg verantwortlich, der die Translation von verschiedenen Proteinen steuert, die den Zellzyklus regulieren oder die Antwort der Tumorzelle auf hypoxischen Stress mitbestimmen (Voss et al. 2011).

Der Antitumoreffekt der „Rapaloge“ kann daher auch auf einer reduzierten HIF- und VEGF-Bildung und damit einer verminderten Angiogenese beruhen. Patienten unter Temsirolimus/Everolimus leben im Mittel 10,9 Monate, unter Interferon- α 7,3 und mit der Kombination beider Substanzen 8,4 Monate (Hudes et al. 2007). Auch das progressionsfreie Überleben war signifikant länger. Patienten unter 65 Jahren überlebten (median) länger als ältere Menschen.

1.5 Bombesinähnliche Peptide

Neben der Beeinflussung der Tumorprogression durch die Hemmung des proangiogenen Zytokins VEGF ist auch die Bedeutung anderer peptidartiger Wachstumsfaktoren untersucht worden. So konnte gezeigt werden, dass Nierenzellkarzinome gefässassoziierte Somatostatinrezeptoren exprimieren, deren Stimulation über eine Veränderung des Blutflusses im Tumor zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen könnte (Heuser et al. 2005).

Neben Somatostatinrezeptoren findet man auch andere Rezeptoren für peptiderge Wachstumsfaktoren auf der Oberfläche der Nierenzellkarzinome, wobei in dieser Arbeit vor allem der Einfluss der Blockade von Rezeptoren für Gastrin Releasing Peptide untersucht werden soll (Heuser et al. 2005).

1.5.1 *Gastrin Releasing Peptide* (GRP) – Nicht-onkologische Bedeutung

GRP ist aus 27 Aminosäuren aufgebaut. Es wird von neuroendokrinen Zellen des Magens (Antrum) und des Duodenums sowie von Pituizyten des Zentralnervensystems gebildet, zudem wurden diese Zellen zwischenzeitig auch in den Lungen von Neugeborenen und Erwachsenen nachgewiesen. GRP steigert die Gastrinsekretion in den G-Zellen des Magens und damit die Bildung von Magensäure. Desweiteren führt das Neuropeptid zu einer Steigerung der Pankreasenzymsekretion. An der glatten Muskulatur besonders von Magen und Gallenblase führt GRP zur Kontraktion, damit zu einer raschen Magenentleerung. Zur Familie der bombesinähnlichen Peptide gehören auch Litorin und Neuromedin B, die als spezifische Agonisten wirken. GRP bindet an einem spezifischen 7-transmembran-spanning G protein-coupled (heptaspanning) Rezeptor (GRPR). Das *Gastrin Releasing Peptide* ist das Peptidanalogue zum Amphibienpeptid Bombesin, das zuerst in der Rotbauchunke (*Rana bombina*) 1971 charakterisiert wurde. Es besteht aus 14 Aminosäuren. Neun der letzten zehn Aminosäuren am C-terminalen Ende stimmen bei Bombesin und GRP (*Gastrin Releasing Peptide*) überein und stellen den biologisch aktiven Anteil der Substanz und gleichzeitig das kürzeste Fragment dar, das an den GRP-Rezeptor binden kann (Nishi et al. 1985).

1.5.2 Die Bedeutung von *Gastrin Releasing Peptide* für die Tumorprogression

Die onkologische Bedeutung von *Gastrin Releasing Peptide* (GRP) für verschiedene Tumorarten ist groß. Die Peptide Bombesin und sein humanes Analogon *Gastrin Releasing Peptide* (GRP) spielen eine wichtige Rolle als Mitogene für benigne und maligne Gewebe *in vitro* und *in vivo* (Pansky et al. 2000, Morisset et al. 2000, Yegen 2003, Xiao et al. 2003, Cornelio et al. 2007, Hohla und Schally 2010, Ischia et al. 2014). Drei Säugetier GRP-Rezeptoren sind heute gut bekannt (Jensen et al. 2008). Der GRP-Rezeptor (GRPR), der BBN-Rezeptor Subtyp 3 (BRS-3-R) und der Neuromedin-B Rezeptor (NMBR). Der GRP-Rezeptor ist in verschiedenen Tumorarten überexprimiert, deshalb könnten *Gastrin Releasing Peptide* (GRP) und sein Analogon Bombesin

(BBN) eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Lungen-, Kolon-, Endometrium-, Magen-, Pancreas-, und Brust-Ca spielen (Schally 2008, Reubi 2013).

Es konnte auch nachgewiesen werden, dass das Nierenzellkarzinom im Gegensatz zum normalen Nierengewebe den GRP-R exprimiert (Pansky et al. 2000, Bedke et al. 2010). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass bombesinähnliche Peptide das Wachstum von Nierenzellkarzinomzellen (CAKI-2) stimulieren. Dieselbe Studie hat gezeigt, dass GRP-R mRNA im Nierenzellkarzinom überexprimiert wurde; im normalen tumorfreien Gewebe war GRP-R mRNA kaum detektierbar. Das Wachstum des Nierenzellkarzinoms ist multifaktoriell determiniert. Wachstumsfaktoren wie TGF- α und - β , Somatostatin, EGF und TNF- α spielen für die Progression eine bedeutende Rolle. Ob GRP bzw. der GRP-R ebenfalls in die Progression mit einbezogen sind, bleibt derzeit unklar. Die Neoangiogenese des Nierenzellkarzinoms kann durch GRP-Rezeptor-Antagonisten beeinflusst werden, da GRP-Rezeptoren nicht nur die Tumorzellproliferation fördern, sondern eine wichtige Rolle für die Mikrozirkulation spielen (Heuser et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass gezielte Chemotherapie mit zytotoxischem Bombesin/GRP Analogon AN-125, das Wachstum von Nierenzellkarzinom hemmen kann (Keller et al. 2005). Eine andere Studie konnte die Bedeutung der zytotoxischen Analoga von LHRH, Somatostatin und Bombesin in der Behandlung diverser Tumoren nachweisen (Schally und Nagy 2003).

Es gibt dabei Hinweise, dass GRP nicht nur als epithelialer Wachstumsfaktor, sondern auch perfusionssteigernd und proangiogen wirkt. Diesbezüglich konnten intravitalmikroskopische Studien belegen, dass es durch eine Hemmung von *Gastrin Releasing Peptide* (GRP) mittels des GRP-Antagonisten RC 3095 zu einer Abnahme der mikrovaskulären Perfusion in Organendstromgebieten kommen kann (Heuser et al. 2000). Als Mechanismen werden sowohl präkapilläre arterielle Vasokonstriktion als auch Querschnittsabnahme in postkapillären Venolen diskutiert.

Unter Berücksichtigung der onkologischen Bedeutung von GRP bzw. GRP-R und aufgrund der Tatsache, dass es bis heute noch keine zufriedenstellende Therapie des Nierenzellkarzinoms gibt, lohnt es sich, die Beeinflussung des

Nierenzellkarzinoms im Tierversuch durch die GRP-Antagonisten zu untersuchen mit der Hoffnung, neue Therapiemöglichkeiten zu entdecken.

1.6 Modelle zur Beobachtung von Tumorwachstum *in vivo*

Die Untersuchung des Verhaltens maligner Tumoren in Kleintiermodellen und ihre therapeutische Modulation stellt nach wie vor eine wesentliche Komponente klinisch orientierter Grundlagenforschung dar (Heuser et al. 2007).

1.6.1 Histologie

Für die Beurteilung des Tumorwachstums müssen hohe Tierzahlen eingesetzt werden, um das Tumorwachstum und die Metastasierung eines Tumors zu einem bestimmten Zeitpunkt durch Sektion der Versuchstiere zu bestimmen. Grund für ein solches Studiendesign ist im Allgemeinen das Fehlen adäquater Bildgebungstechniken, die die Erfassung der Tumorbiologie *in vivo* ermöglichen (Céspedes et al. 2006).

1.6.2 Intravitalmikroskopie

Eine weitere Möglichkeit der Erfassung des Tumorverhaltens stellt die Intravitalmikroskopie dar. Mit Hilfe dieses Verfahrens lässt sich z.B. die Gefäßneubildung in orthotop oder heterotop implantierten Tumoren über einen kürzeren oder auch längeren Zeitraum von Wochen erfassen (Baron et al. 2011, Beerling et al. 2011, Heuser et al. 2003). Die Methode ist mit dem Nachteil behaftet, dass zur intravitalem Beobachtung der Tumorangiogenese entweder eine Tierpräparation verwendet werden muss, bei der der Tumor an der Oberfläche des Tieres liegt (Hamsterbackentasche, dorsale Rückenhautkammer) oder es sind repetitive Operationen nötig, um die Tumoroberfläche freizulegen. Die intravitale Auflichtmikroskopie ist im Hinblick auf die Eindringtiefe limitiert. Sie ist insbesondere geeignet zur Beurteilung der frühen Tumorpropagation und –metastasierung.

1.6.3 Die Rolle der Flachdetektor-Volumen-Computertomographie (fpVCT) in der Untersuchung der Progression von Tumoren in Kleintieren

Dagegen ist die Kleintier-Computertomographie ein nicht invasives Verfahren, dass in der Eindringtiefe nicht limitiert ist und eine Erfassung des gesamten Versuchstieres mittels eines Scans erlaubt (Heuser et al. 2007). Klinisch heute überall verfügbare *Multi-slice* Computertomographen sind für die Erfassung von Tumoren in Kleintieren wie Mäusen und Ratten nicht geeignet, da selbst die Auflösung eines 64-Zeilen Gerätes nicht unter 0.6 mm liegt. Mit einer solchen Auflösung sind insbesondere in der Frühphase exakte Aussagen über die Ausdehnung eines Tumors im Kleintiermodell nicht möglich. Flachdetektor-Volumen-Computertomographie ist dem *Multidetector-row-CT* (MDCT) in der genauen Bestimmung der pulmonalen Lymphknoten mit einem Durchmesser <5 mm überlegen (Marten et al. 2009) und übertrifft die Ergebnisse des *Multi-Slice-CT* (MSCT) in der Darstellung von Nagetieren und der Volumetrie von kleinen Objekten (Obenauer et al. 2007 a und b).

Die Flachdetektor-Volumen-Computertomographie (fpVCT) stellt eine komplette Neuentwicklung von Computertomographen dar (Knollmann et al. 2006), die auch im tierexperimentellen Bereich Anwendungsmöglichkeit findet. Kernstück dieser Entwicklung sind Flachbilddetektoren, mit deren Hilfe eine maximale Auflösung von 0.2 mm erreicht wird. Damit eignet sich diese Bildgebungstechnik in besonderer Weise für die nicht invasive repetitive Untersuchung des Tumorverhaltens in Kleintieren (Literatur in Heuser et al. 2007). Mit Hilfe der Flachdetektor-Volumen-Computertomographie (fpVCT) kann man intrarenale Mikrogefäße mit einem Durchmesser von 0,03 mm darstellen, so dass im Verlauf ein Vergleich zwischen der gesunden und pathologischen Architektur des Nierengewebes eventuell möglich ist (Neukamm et al. 2009).

1.7 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Durch die Kombination eines innovativen bildgebenden Verfahrens (Volumen-Computer-Tomographie) mit einem orthotopen Nierenzellkarzinommodell sowie morphologischen Methoden soll an der Nacktmaus untersucht werden, inwieweit das bildgebende Verfahren geeignet ist, die Bildung von Nierentumoren zu diagnostizieren.

Durch Einsatz von Antagonisten des GRP-Rezeptors sollte überprüft werden, ob eine Beeinflussung der Tumorentwicklung eintritt und bildgebend dargestellt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsgruppen

Eine Gruppengröße von 9 Versuchstieren wurde gewählt, weil sich nach den bisherigen Erfahrungen mit dieser Tieranzahl auswertbare Ergebnisse erzielen lassen. In der ersten Gruppe von 9 Mäusen wurde keine Therapie mit der Substanz RC 3095 durchgeführt. Auf die Durchführung von Scheininjektionen mit Kochsalz wurde in dieser Kontrollgruppe verzichtet. Der zweiten Gruppe von 9 Mäusen wurde einmal täglich subkutan RC 3095 injiziert (56 Injektionen). Die Mäuse wurden zweimal mittels fpVCT in einer Isofluran-Inhalationsnarkose untersucht (4 und 8 Wochen nach Injektion der Zellen).

2.2 Versuchstiere

Für die orthotopen Tumorimplantationen wurden männliche athymische, haarlose Mäuse mit einem Alter von 6-8 Wochen und einem Gewicht um 30 g verwendet, die vom Züchter Harlan Winkelmann aus Gartenstraße 27, 33178 Borchen, Deutschland bezogen wurden.



Abbildung 2.1 männliche athymische haarlose Mäuse mit einem Alter von 6-8 Wochen und einem Gewicht um 30 g.

Die Tiere wurden unter normalen Versuchsbedingungen gehalten, hatten Zugang zu einer Standarddiät für Nager und unterlagen einem 24-Stunden-Tag/Nacht Rhythmus. Das Versuchsvorhaben wurde von der zuständigen Behörde in Oldenburg genehmigt (Tumormodell: 509.42502/01-38.98). Aus Vorversuchen (Versuchsprojekt 38.1998) ist bekannt, dass Tumormimplantate, bestehend aus A-498-Zellen, in dieser Mauslinie mit einer Angehrate von bis zu 60 % angehen (Heuser et al. 2007).

2.3 Materialien

Steriles Handtuch	Hartmann, Heidenheim
Sterile Kompressen	Hartmann, Heidenheim
Vicryl [®] Fäden 3/0 und 4/0	Ethicon, Johnson and Johnson, Neuss
Sterile Wattestäbchen	Karl Beese, Barsbüttel
Clexane Spritzen	BD Plastikpak, Spain
Kanülen 27G	Braun, Melsungen
Kanülen 22G	BD Microlance, Fraga, Spain
Mikrochirurgische Schere	Aesculap, Melsungen
Nadelhalter	Aesculap, Melsungen
Sterile Handschuhe	Ansell, Deutschland
Mikrochirurgische Pinzette	Aesculap, Melsungen

Tabelle 2.1

Natriumchlorid	Braun, Melsungen
Ketamin	Ratiopharm, Ulm
Rompur [®] 2% (Xylazin)	Bayer AG, Leverkusen
GRP-Antagonist RC-3095	Zentaris AG, Frankfurt
Ultravist [®]	Bayer AG, Leverkusen

Isofluran	Isofluran-Actavis, München
Novalgin [®] (Metamizol)	Sanofi-Aventis, Berlin
Temgesic [®] (Buprenorphin)	Reckitt Benckiser, Mannheim
Kodan [®] (Propanol/Biphenylol)	Schülke-Mayr, Norderstedt
A498 Tumorzellen	DSMZ Braunschweig
Hämatoxylin	Roche, Grenzach-Wyhlen

Tabelle 2.2

Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation :

Zur Präparation der Tumorzellen (70% konfluent) wird am Vortag das Zellmedium erneuert. Nach Trypsinierung werden sie in 10 ml RPMI + 10% FCS resuspendiert. Nach Auszählen der Zellen wird sichergestellt, dass mehr als 90% der Zellen vital sind (Trypan Blaufärbung). Nach 10 minütiger Zentrifugation werden die Zellen in PBS (minus Ca²⁺ und Mg²⁺), 2% FCS resuspendiert.

Flachdetektor Volumen- Computertomographie	General Electric Global Research, Niskayuna, NY
Olympus Mikroskop BX41 (Urologie)	Hamburg, Deutschland
Wärmeplatte Typ TRZ 3700	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reut- lingen
Waage CP4201	Sartorius, Göttingen
Olympus Mikroskop 4-MDOB3 (Pathologie)	Hamburg, Deutschland
Histolab-Programm, Microvision Instruments, Morphometrie- Programm	Evry, Frankreich

Tabelle 2.3

2.4 Methoden

2.4.1 Vorbereitung und Narkose

Zunächst werden die Mäuse untersucht und gewogen. Es erfolgt eine Markierung der Mäuse im Bereich des linken Ohrs. Die Tumorzellimplantation wird unter sterilen Bedingungen in den Laborräumen der Zentralen Tierexperimentellen Abteilung durchgeführt. Für die Durchführung der Präparation ist eine Allgemeinanästhesie erforderlich. Die benutzte Narkoseform ist eine intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Ketamin sowie 5 mg/kg Xylazin (Volumen: 0.12 ml intraperitoneal). Charakteristisch für die Wirkung des Ketamin ist die Erzeugung einer sogenannten *dissoziativen Anästhesie*. Darunter wird die Erzeugung von Schlaf und Schmerzfreiheit unter weitgehender Erhaltung der Reflextätigkeit, insbesondere der Schutzreflexe, verstanden. Weiterhin wirkt diese Form der Anästhesie hemmend auf die periphere Wiederaufnahme von Katecholaminen wie Noradrenalin und Dopamin an der synaptischen Endplatte mit Verstärkung endogener wie exogener Katecholamineffekte. Durch diese Mechanismen kommt es zu einer ausgeprägten Stimulation des Herz-Kreislauf-Systems, z. B. zu erhöhtem Herzvolumen, gesteigerter Herzfrequenz, erhöhtem Puls und erhöhtem Venendruck. Diese Effekte müssen bei der Einleitung der Narkose berücksichtigt werden. Die Atmung muss spontan bleiben. Bei Auftreten von Nebenwirkungen wird auf eine Operation verzichtet und nach entsprechender Dosisreduktion im Verlauf eine erneute Tumorzellimplantation versucht.

2.4.2 Operation

Nach sterilem Abwaschen und Abdecken in Rückenlagerung auf einer Wärmeplatte erfolgt zuerst ein linksseitiger vertikaler Pararektalschnitt von ca. 5-6 mm Länge. Eröffnen des Peritoneums. Eingehen laterokolisch links und minimale Abpräparation des *Colon descendens* von der Niere. Nach Abdrängen des Darmes nach rechts wird der Unterpol der linken Niere aufgesucht und die Niere an ihrem kaudalen Fettbürcel nach

ventral gezogen, ohne dabei den Ureter zu fassen. Die Niere wird dann in dieser Lage gehalten, und mit einer 1-ml-Spritze und einer Kanüle (27 G, Braun, Melsungen) werden 10^6 Tumorzellen der klarzelligen Nierenkarzinomzelllinie A-498 (DSMZ Braunschweig) in 0.2 ml einer Phosphat-gepufferten Elektrolytlösung (PBS, Sigma, München) unter die Nierenkapsel injiziert. 0,2 ml Implantat werden vorgehalten und injiziert, um bei einer möglichen Fehlinjektion in etwas tiefere Schichten die Implantation einer ausreichenden Tumorzellzahl subkapsulär zu gewährleisten. Als Kontrolle der korrekten Implantation dient dabei die Formierung einer gut sichtbaren, flüssigkeitsgefüllten Blase, entstanden durch die Abhebung der fibrösen Nierenkapsel.

Nach Implantation Kontrolle auf Bluttrockenheit. Rückverlagerung des Darmes. Schichtweiser Wundverschluss mit fortlaufender Naht des Peritoneums, Hautnaht mit Vicryl®-Fäden der Stärke 4/0. Belassen der Maus auf der Wärmeplatte, bis sie sich von dem Eingriff erholt hat.

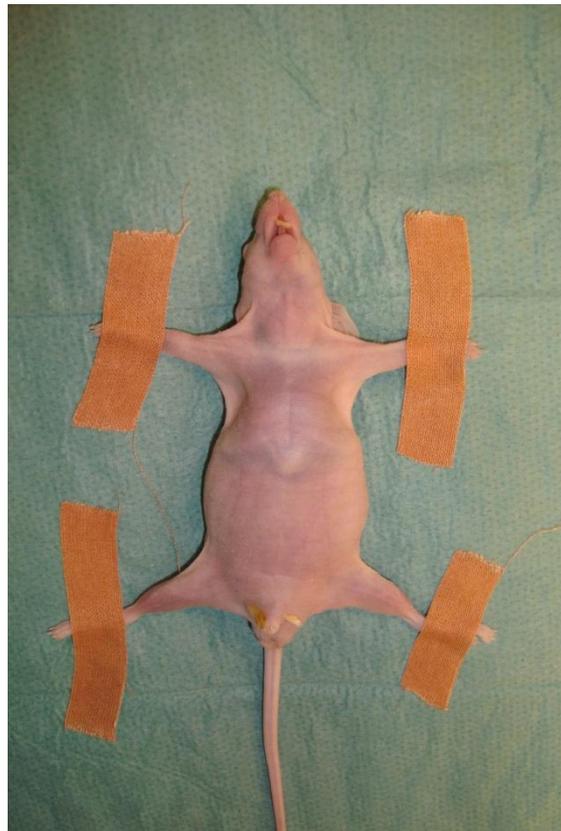


Abbildung 2.2

Rückenlagerung und steriles Abwaschen

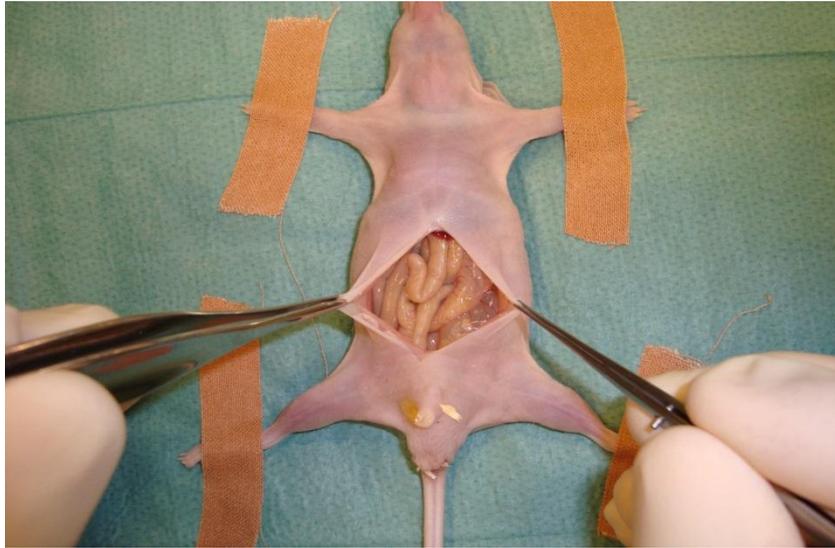


Abbildung 2.3
Eröffnen des Peritoneums



Abbildung 2.4
Stumpfe Nierenfreilegung



Abbildung 2.5

Tumorzelleninjektion in den linken Unterpol



Abbildung 2.6

Formierung einer gut sichtbaren, flüssigkeitsgefüllten Blase



Abbildung 2.7

Postoperative Erholung auf der Wärmeplatte

2.4.3 Postoperative Behandlung

Das Wachsen der Tumorzellen bedeutet keine zusätzliche Belastung, die Tiere sehen vom Aspekt her nicht krank aus. Postoperativ können Wundschmerzen auftreten, die behandelt werden müssen. Die postoperative Analgesie der Tiere erfolgt mit Metamizol (Novalgin®) oder bei stärkeren Verhaltensänderungen kann postoperativ mit Buprenorphin (Temgesic®) behandelt werden. Novalgin kann in Dosierungen von 500 mg dem Trinkwasser im Napf beigefügt werden. Die Buprenorphin-Applikation erfolgt intramuskulär durch Injektion von 0,1-0,5 mg/kg pro 24 Stunden.

Es wurden klare Abbruchkriterien formuliert:

<u>Abbruchkriterien</u>	
*	Entzündung oder Vereiterung der Wunde
*	Gewichtsverlust >15% gegenüber Startgewicht, über mehr als 48 Stunden anhaltend
*	Zeichen der generalisierten Entzündung, auffälliges bewegungsloses Verharren im Käfig
*	Futter- oder Wasserverweigerung
*	Ulzerierende Hautmetastasen

Tabelle 2.4

Bei Zutreffen eines der genannten Punkte erfolgt der Abbruch des Experimentes und die Tötung des Tieres.

Injektion des GRP-Antagonisten: Die Injektion des GRP-Antagonisten RC-3095 (Zentaris AG, Frankfurt) bei der zweiten Gruppe erfolgt einmal täglich subkutan (40 µg) ab dem 1. postoperativen Tag alle 24 Stunden bis zur Tötung der Maus. Die Konzentration wird dabei so gewählt, dass der Maus ein Volumen von 100 µl *Aqua ad injectionem* injiziert werden muss, um diese Menge des Antagonisten zu erreichen.

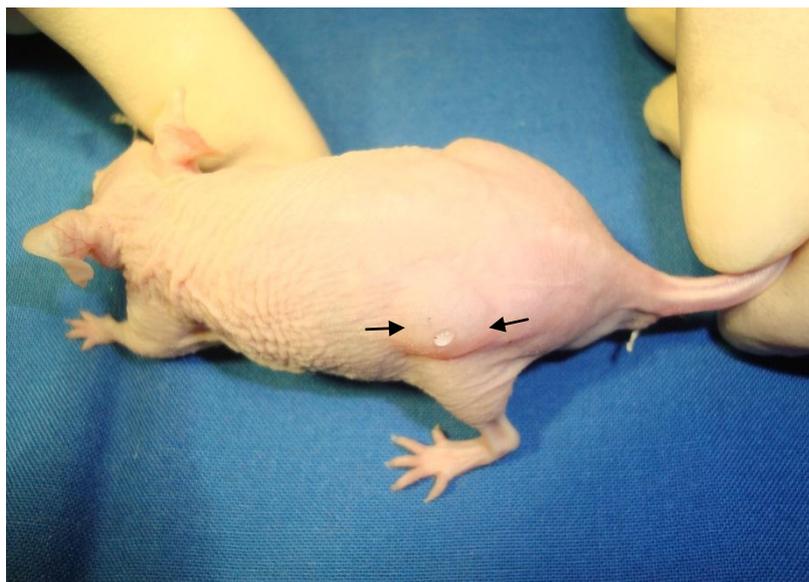


Abbildung 2.8

Subkutane Injektion des GRP-Antagonisten

Kontrollgruppe: Mäuse der Kontrollgruppe erhielten keine Injektion. Dieses Vorgehen wurde nach den Erfahrungen von Vorversuchen der Gruppe Heuser et al 2005 gewählt.

2.4.4 Durchführung der fpVCT

Der fpVCT Prototyp (General Electric Global Research, Niskayuna, NY), der in der Abteilung für Radiologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung steht, besteht aus 2 Flachbettdetektoren aus amorphem Silicium (a-Si), die ein Kantenmass von 20.5 x 20.5 cm mit 1024 x 1024 Pixeln besitzen. Jeder Pixel besitzt eine Fläche von 200 µm x 200 µm. Die Ausleserate des Detektors beträgt ca. 30 Hz und erlaubt eine Rate von etwa 1000 Bildern in etwa 30 Sekunden. Die Röntgenröhre rotiert in der Gantry, genau gegenüber sind die Detektoren montiert. Je nachdem, ob beide Detektoren angesprochen werden oder nur einer, hat die Bildakquisition ein Flächenmass von 12.8 cm x 12.8 cm oder 33.3 cm x 33.3 cm. Damit ist das CT für kleinere Versuchstiere hervorragend geeignet. In unserer Untersuchung war das CT so konfiguriert, dass etwa 1000 Projektionen in ca. 8 s ausgelesen wurden (Heuser et al. 2007).



Abbildung 2.9

Das fpVCT unserer Abteilung für Radiologie

Es handelt sich hierbei um ein nicht-invasives Verfahren zur hochauflösenden Bildgebung von narkotisierten Kleintieren mit einer Ortsauflösung von zirka 150 µm in allen Bildebenen, so dass ein Staging und Monitoring von narkotisierten Tieren möglich ist. Dabei ist die Untersuchung aufgrund der schnellen Scan-Zeiten des VCT-Systems auch nach intravenöser Kontrastmittel-Gabe (200 µl Ultravist® 300 in die Schwanzvene des Tieres) mit verbesserter Detektion von Tumoren, wie Vorversuche gezeigt haben, möglich. Unmittelbar nach Beendigung der Injektion des Kontrastmittels in die Schwanzvene wird die Maus in die Gantry verbracht und der Scan beginnt wie vorbeschrieben. Die Einstellungen des fpVCT waren für die zwei Untersuchungen identisch (80 kV, 100 mA). Die VCT bietet die Möglichkeit des sensitiven Nachweises von Primärtumoren und Metastasen im Kleintier innerhalb kürzester Untersuchungszeiten von wenigen Sekunden. Diese kurzen Untersuchungszeiten stellen aufgrund der Reduktion respiratorisch und kardial bedingter Bewegungsartefakte einen erheblichen Vorteil gegenüber herkömmlichen Mikrocomputertomographiesystemen dar. Da die VCT-Untersuchung beliebig mit reproduzierbaren Ergebnissen wiederholt werden kann, bietet sich diese Untersuchungs-Technik auch zum Monitoring der Tumoren sowie etwaiger Fernmetastasen unter Therapie an, da eine Volumetrie des Tumors mittels einer an dem VCT-System installierten Software durchgeführt werden kann (Missbach-Guentner et al. 2007 und 2008, Obenauer et al. 2007 a und b). Die VCT-Untersuchung ist in einer Isofluran-Inhalationsnarkose durchgeführt worden (Tierärztin der Abteilung Tierexp. Einrichtungen). Ein entsprechender Inhalator ist in der Radiologischen Abteilung vorhanden. Die Auswertung der gewonnenen Ergebnisse erfolgte zusammen mit der Unterstützung der Abteilung Diagnostische Radiologie.

Die Untersuchung der Tiere erfolgt zu den Zeitpunkten:

- 4 Wochen nach Tumorimplantation
- 8 Wochen nach Tumorimplantation

Bereits nach der ersten Untersuchung darf das Tier nicht mehr in die ursprünglichen Räume der Tierexperimentellen Abteilung verbracht werden. Eine Auslagerung erfolgte in Extraräume.

2.4.5 Tötung der Mäuse und Sektion

Nach dem Abschluss der zweiten Computertomographie wurden die Mäuse durch Ketamin-Gabe getötet. Es erfolgt dann die Sektion in der Pathologie und die Aufbewahrung der Organe in Formalin zur späteren histologischen Aufarbeitung.

2.4.6 Pathohistologie

Zur Untersuchung wurden die tumortragende Niere sowie die kontralaterale Niere, die Lungen, Leber und Milz in 4% neutral gepufferten Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die histologischen Untersuchungen erfolgten an 1 bis 2 Mikrometer dicken Paraffinschnitten, die auf Objektträger aufgezogen wurden, die zuvor mit 1 M Salzsäure gereinigt und mit 2% 3-Aminopropyltriethoxy-Silan in Aceton beschichtet worden waren. Von allen Präparaten wurde zu Beginn eine Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefertigt. Dazu wurden die Objektträger für ca. 20 Minuten in den Trockensterilisator gestellt (80°C) und anschließend entparaffiniert. Die Kerndarstellung erfolgte für 10 Minuten in Hämatoxylin (Meyers Hämalaun). Nach gründlichem Bläuen in Leitungswasser wurde die zytoplasmatische Gegenfärbung für ca. 30 Sekunden in Eosin durchgeführt. Nach erneutem Spülen in entionisiertem Wasser konnten die Schnitte anschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %) rehydriert und über Xylol permanent eingedeckt werden.

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Olympus Mikroskop 4-MDO B3 (siehe Tabelle 2.3) mit 40facher und 100facher Vergrößerung. Längsschnitte durch die gesamte Niere wurden untersucht.

(Die histologische Aufarbeitung und Untersuchung erfolgte in der Abteilung für Pathologie - Direktor Prof. Dr. Radzun – in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Hemmerlein)

2.4.7 Morphometrie

Nach der histologischen Aufarbeitung wurde eine mikroskopische morphometrische Untersuchung an den Schnittpräparaten durchgeführt. Es wurde im Längsschnittpräparat die Fläche des Nierentumors im Vergleich zur Schnittfläche der Niere auf dem Objektträger mit Hilfe des in der Pathologie etablierten Morphometrieprogramms bestimmt. Mit dem Histolab-Programm wird ein Übersichtsscan in vierfacher Vergrößerung des Olympusmikroskops durchgeführt und der Scan dann semi-automatisch morphometriert.

3 Ergebnisse

3.1 Tierexperimentelle Daten

In dieser Arbeit wurden insgesamt 18 Mäuse untersucht in 2 Gruppen von 9 Tieren. Der Beobachtungsraum betrug 8 Wochen. 2 von 9 Mäusen der ersten, unbehandelten Gruppe sind wenige Tage nach Durchführung der ersten VCT gestorben. Von der zweiten, behandelten Gruppe ist keine Maus vor Abschluss des Projektes gestorben.

	Gruppe 1 (unbehandelt)	Gruppe 2 (behandelt)
Frühzeitig gestorben	2	0
Tumorentwicklung	4	5
Ø Tumorentwicklung	5	4
Metastasierung kontralaterale Niere	2	0
Ø Metastasierung kontralaterale Niere	2	5
Lebermetastasen	1	1
Ø Lebermetastasen	3	4

Tabelle 3.1

Von den 2 frühzeitig gestorbenen Mäusen der Gruppe 1 wies eine Maus keine Organmetastasierung auf. Bei der 2. Maus wurde eine ausgeprägte hepatische, bilateral renale, eine subpleurale und retroperitoneale Metastasierung festgestellt.

Ein tumoröser Prozess wurde in der ersten Gruppe mittels VCT in 4 von 9 Mäusen festgestellt.

Ein tumoröser Prozess wurde in der zweiten Gruppe mittels VCT in 5 von 9 Mäusen festgestellt.

Eine Fernmetastasierung in der kontralateralen Niere wurde bei 2 Mäusen der ersten Gruppe nachgewiesen, während in der zweiten Gruppe keine Maus von den insgesamt 5, die einen Tumor entwickelt haben, einen bilateralen Befall hatte.

Eine hepatische Fernmetastasierung wurde bei einer Maus der ersten und einer Maus der zweiten Gruppe festgestellt.

3.2 Volumentomographie

Nach Kontrastmittelgabe stellen sich normale Nieren im VCT dar, wie in der Abbildung 3.1 vorgestellt.

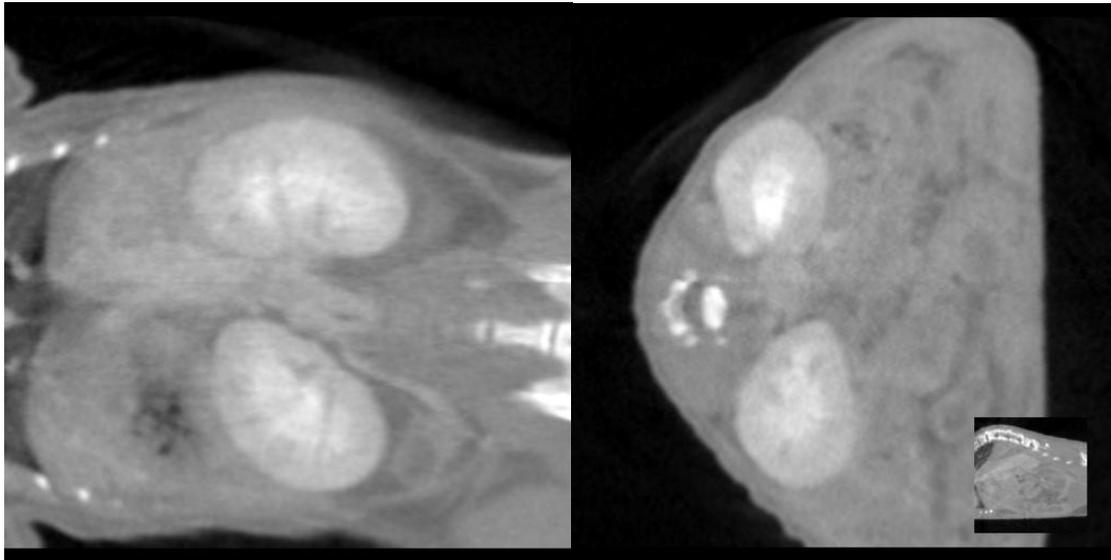


Abbildung 3.1

Normale Darstellung der beiden Nieren nach KM-Gabe im sagittalen und transversalen Schnitt.

Die Bildbearbeitung gestattet auch eine 3D Rekonstruktion.

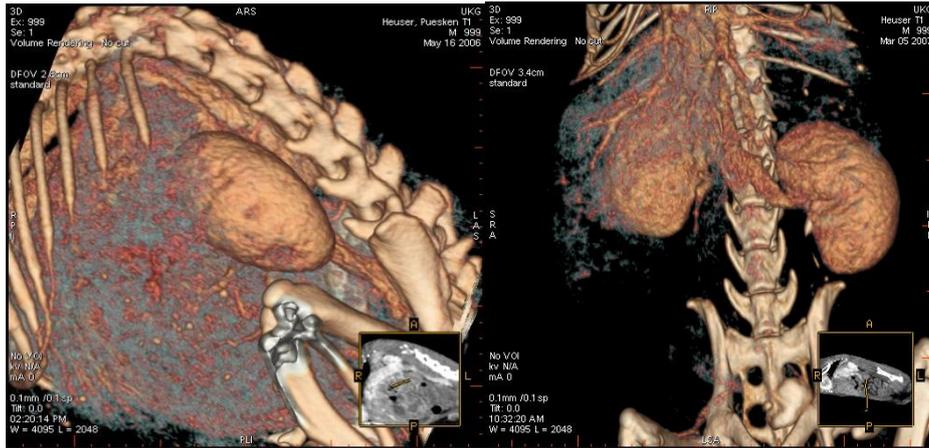


Abbildung 3.2

3D Rekonstruktion normaler Nieren

Nach Injektion von 10^6 Tumorzellen subkapsulär in die linke Niere unter Bildung einer Blase, konnte man nach 4 oder 8 Wochen bei insgesamt neun Mäusen einen Nierentumor bildgebend mittels VCT nachweisen.

Abbildung 3.3 zeigt einen großen Nierentumor links bei Maus 7, die zur unbehandelten Gruppe gehört. Die tumortragende Niere wird im Sagittalschnitt des längsten Nierendurchmessers und im Transversalschnitt dargestellt.

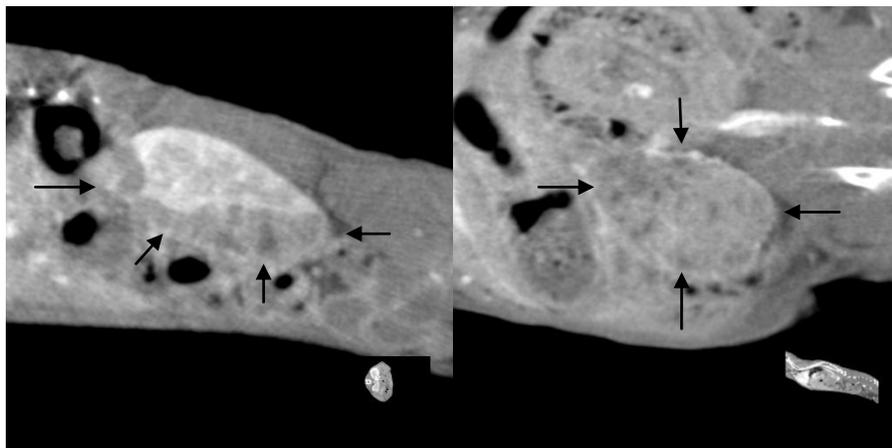


Abbildung 3.3

Großer Nierentumor links, Maus 7, 1. Gruppe

Abbildung 3.4 zeigt an der gleichen Maus exemplarisch das Ausmessen des Tumors in 2D Verfahren.

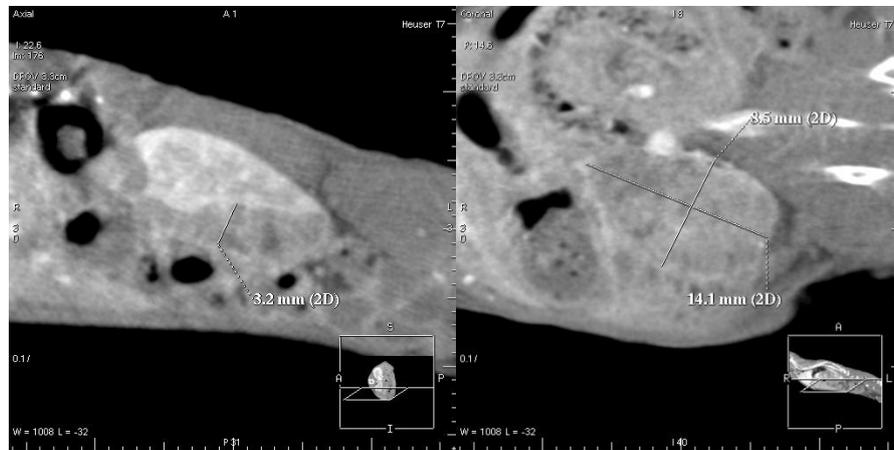


Abbildung 3.4

Ausmessen des o. g. Tumors, Maus 7, 1. Gruppe

Abbildung 3.5 verdeutlicht bei diesem Tumor die Volumetrie, die mit einem gängigen Volumetrieprogramm bestimmt wird.

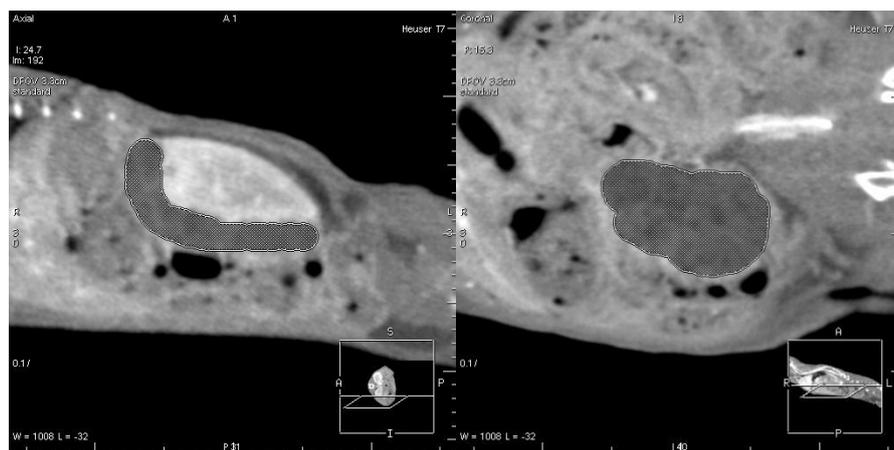


Abbildung 3.5

Bestimmung des Tumolvolumens, Maus 7, 1. Gruppe

Eine 3D Rekonstruktion allein des volumetrierten Tumors dieser Maus 7, zeigt Abbildung 3.6.

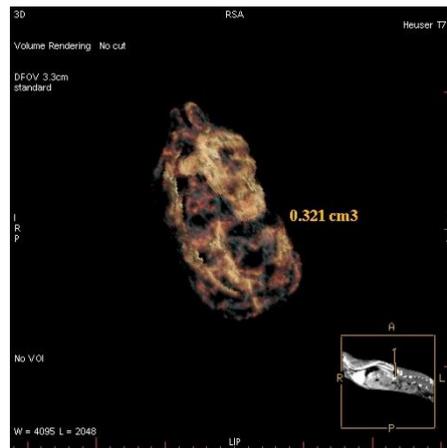


Abbildung 3.6

Volumetrie des o. g. Tumors
Maus 7, 1. Gruppe

Ein weiteres Beispiel der computergesteuerten Volumetrie eines großen Nierentumors zeigt Abbildung 3.7.

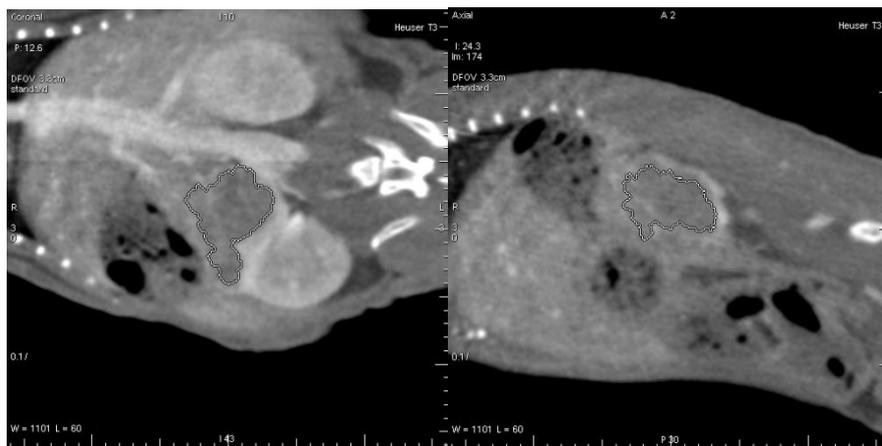


Abbildung 3.7

Volumetrie Nierentumor links

Eine hepatische Metastasierung wurde zweimal beobachtet. Abbildung 3.8 zeigt die ausgeprägte hepatische Metastasierung der Maus 8 aus Gruppe 1, die nach dem ersten VCT verstorben ist. Eine Volumetrie der hepatischen Metastasierung und eine anatomische Zuordnung zu Lebersegmenten wird nicht durchgeführt. Ein VCT der Herz und Lungenorgane wird nicht durchgeführt.

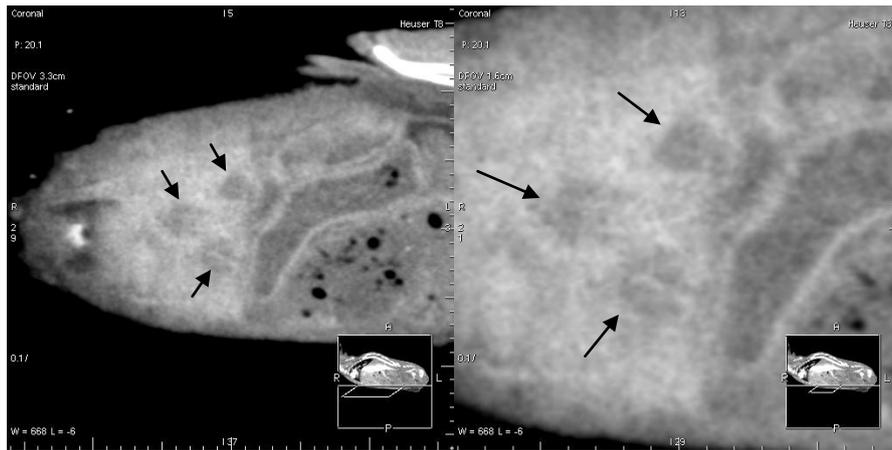


Abbildung 3.8

Hepatische Metastasen, Maus 8, 1. Gruppe

Entsprechend der gezeigten Beispiele wird die Volumetrie der Tumoren in den Nieren der unbehandelten und der behandelten Mäuse durchgeführt.

Maus	Gruppe 1 (unbehandelt)	
	1. VCT	2. VCT
1	kein Tumor	kein Tumor
2	kein Tumor	kein Tumor
3	0,023 cm ³	0,143 cm ³
4	kein Tumor	verstorben
5	kein Tumor	kein Tumor
6	0,054 cm ³	0,326 cm ³
7	0,038 cm ³	0,321 cm ³
8	0,420 cm ³	verstorben
9	kein Tumor	kein Tumor

Tabelle 3.2

In der ersten unbehandelten Gruppe weisen im ersten VCT 4 Tiere Tumor auf. Die Volumetrie zeigt drei kleine und einen großen Tumor (Maus 8). Maus 8 ist vor Durchführung des zweiten VCT verstorben. In den drei anderen tu-

mortragenden Nieren hat sich die Tumorlast beim zweiten VCT vergrößert. In Maus 3 und Maus 6 etwa um das 6 fache, in Maus 7 um das 8 fache.

Bei Beendigung des Experiments war das kleinste beobachtete Nierentumorvolumen $0,143 \text{ cm}^3$ und das größte $0,420 \text{ cm}^3$.

In der zweiten Gruppe ist entsprechend das kleinste Nierentumorvolumen $0,012$ und das größte $0,146$ (bei 5 Tumoren).

Maus	Gruppe 2 (behandelt)	
	1. VCT	2. VCT
1	kein Tumor	$0,057 \text{ cm}^3$
2	kein Tumor	kein Tumor
3	kein Tumor	kein Tumor
4	kein Tumor	$0,091 \text{ cm}^3$
5	$0,015 \text{ cm}^3$	$0,104 \text{ cm}^3$
6	kein Tumor	$0,087 \text{ cm}^3$
7	kein Tumor	kein Tumor
8	$0,020 \text{ cm}^3$	$0,146 \text{ cm}^3$
9	kein Tumor	kein Tumor

Tabelle 3.3

Maus 1, 4 und 6 weisen im ersten VCT keinen Tumor auf. Maus 5 und 8 haben im ersten VCT kleine Tumoren entwickelt, die im zweiten VCT sich um das 7 fache vergrößert haben.

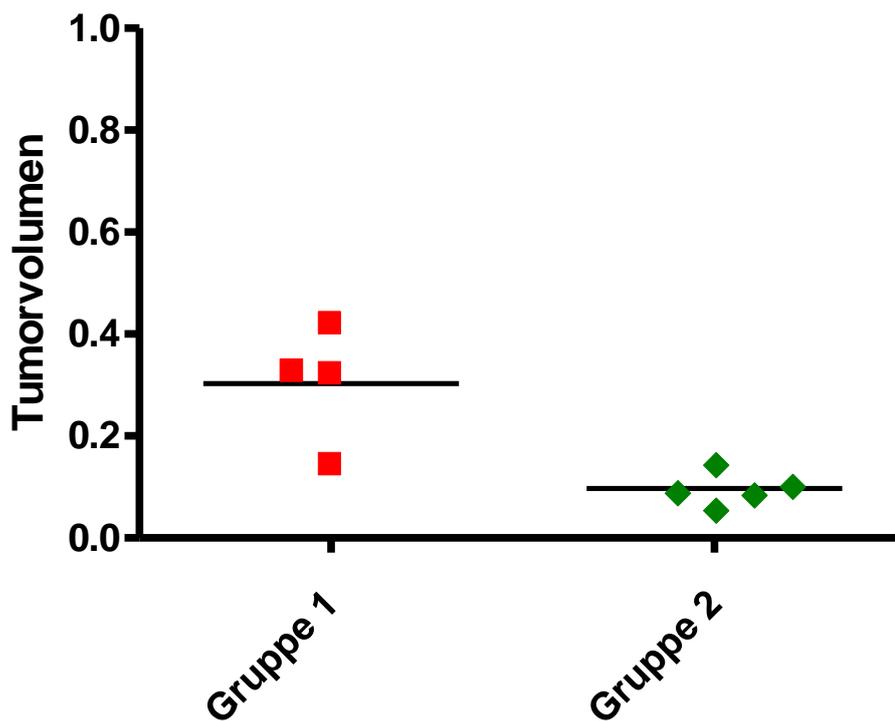


Diagramm 3.1

Darstellung des maximalen Tumorzvolumens zum Zeitpunkt des Ablebens/Tötung.

Das Diagramm 3.1 zeigt im Vergleich der behandelten zu den unbehandelten Tieren eine Reduktion des Tumorzvolumens nach Behandlung. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass in der unbehandelten Gruppe Maus 8, die die größte Tumorentwicklung aufwies, nach Ableben zwischen dem ersten und zweiten VCT-Termin untersucht wurde, während alle übrigen Mäuse nach dem zweiten VCT-Termin geopfert und untersucht worden.

Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, dass:

- 1) die Tumorzvolumina nach Abschluss des Experiments in der behandelten Gruppe 2 deutlich kleiner als in der nicht behandelten Gruppe 1 sind.
- 2) die Tumorentstehung in der Gruppe 2 deutlich verzögert ist. Zwei Mäuse (Maus 1 und 6) haben einen Tumor erst zum Zeitpunkt des zweiten VCT entwickelt. Alle Mäuse in der 1. Gruppe, die einen Tumor entwickelten, haben diesen schon zum Zeitpunkt des ersten VCT.

3.3 Pathohistologie

Alle 18 Versuchstiere werden nach ihrem Ableben in der Pathologie sezziert. Maus 4 und 8 der unbehandelten Gruppe 1 zum Zeitpunkt ihres Exitus nach dem ersten VCT. Alle anderen Tiere werden nach dem zweiten VCT getötet. Bei der Sektion werden beide Nieren, die Lungen, die Leber und die Milz entnommen und in Paraffin eingebettet. Abbildung 3.9 zeigt in A und C den normalen Aufbau einer Mausniere mit 40 facher (A) und 100 facher Vergrößerung (C). Abbildung 3.9 (B) zeigt den orthotop implantierten Tumor in seiner subkapsulären Lage (Sternmarkierung). Die Grenze zur Nierenrinde ist pfeilmarkiert. Abbildung 3.9 (D) ist eine 100 fache Vergrößerung des subkapsulär gewachsenen Tumors. Die Karzinomzellen zeigen eine klarzellige Differenzierung und besitzen mäßiggradige Zell- und Kernpolymorphien.

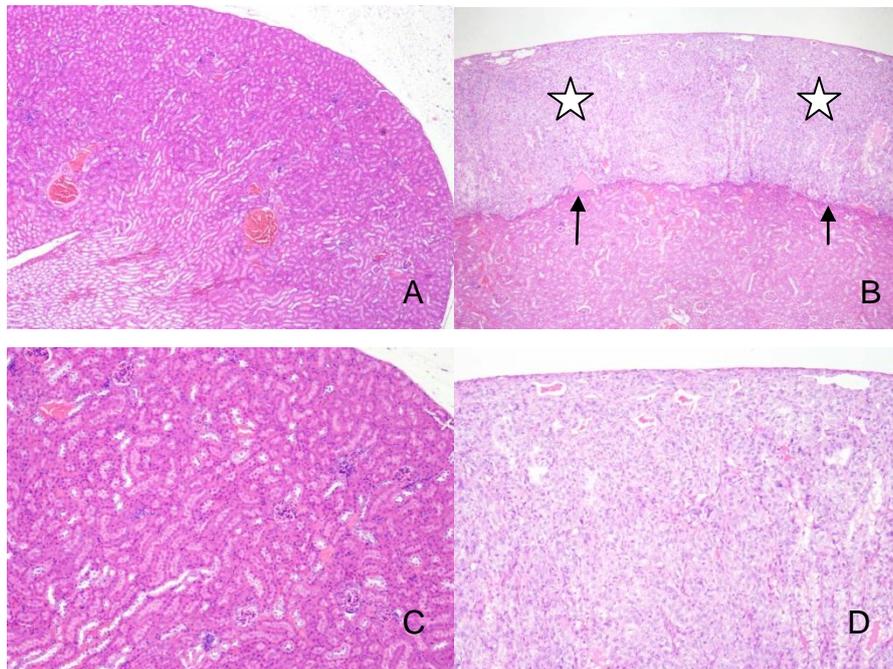


Abbildung 3.9

Histologie der normalen Niere (A, C) und des orthotopen Nierentumors (B, D). (Hämatoxylin-Eosin Färbung; Vergrößerung x40, A,B; Vergrößerung x100, C,D) (Maus 8, 1. Gruppe). Sternmarkierung in B = Tumor, Pfeilmarkierung = Grenze Niere/Tumor.

Die Karzinommetastasen der orthotopen Nierentumoren treten multifokal im Bereich der Leber und beider Lungen auf und sind überwiegend subkapsulär und subpleural lokalisiert. Abbildung 3.10 zeigt in ihren Anteilen A und C eine Lebermetastasierung. In 40 facher Vergrößerung (A), fallen multifokal Herde auf. Der in A pfeilmarkierte Herd wird in C in 100 facher Vergrößerung dargestellt. In ihren Anteilen B und D zeigt diese Abbildung eine subpleural gelegene Lungenmetastase (pfeilmarkiert in B), deren Morphologie in der 100 fachen Vergrößerung der Abbildung D dargestellt ist.

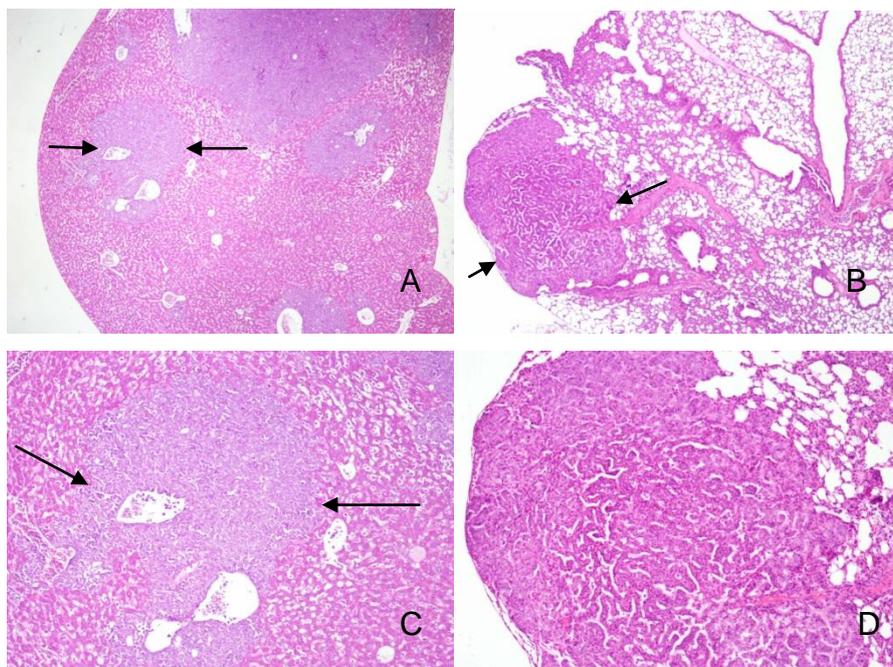


Abbildung 3.10

Histologie der Leber- und Lungenmetastasen des orthotopen Nierentumors Maus 8, 1. Gruppe. Im Bereich der Leber (A, C) sowie der Lunge (B, D). Pfeilmarkierung der Tumoren in A, B und C. (Hämatoxylin-Eosin Färbung; Vergrößerung x40, A,B; Vergrößerung x100, C,D)

3.4 Morphometrie

Um einen zweiten Parameter der Nierentumorgröße im Vergleich zwischen unbehandelten und behandelten Tieren zu haben, wird im Schnittpräparat mikroskopisch mit einem computergesteuerten Morphometrieprogramm des Instituts für Pathologie die Fläche des Tumors im Vergleich zur Gesamtfläche der Niere bestimmt. Jeweils 2 Längsschnitte der tumortragenden Niere, die in ihrem Längsdurchmesser im Bereich des maximalen Tumorwachstums vollständig eingebettet wurde, werden in den beiden Tiergruppen ausgemessen (μm^2). Diese Wahl der Schnittebene bewirkt bei größeren Tumoren, dass bei 4 facher Vergrößerung der Schnitt überall Tumor aufweist. Ein Vergleich mit der in-vivo-Darstellung des VCT ist somit nicht möglich (z.B. Maus 7 Gruppe 1).



Abbildung 3.11

Maus 8.1.Gruppe.Makrophoto des zur Morphometrie verwandten Präparates

		Gruppe 1 (unbehandelt)		
		Fläche Niere	Fläche Tumor	% Tumor/Niere
Maus 3	Präparat 1	93,58	32,64	34,9%
	Präparat 2	94,36	33,28	35,3%
	Mittelwert	93,97	32,96	~ 35 %
Maus 6	Präparat 1	239,12	239,12	100%
	Präparat 2	202,17	202,17	100%
	Mittelwert	220,65	220,65	100%
Maus 7	Präparat 1	92,51	92,51	100%
	Präparat 2	160,38	160,38	100%
	Mittelwert	126,45	126,45	100%
Maus 8	Präparat 1	157,78	79,84	50,60 %
	Präparat 2	129,15	35,16	27,20 %
	Mittelwert	143,47	57,50	~ 39 %

Tabelle 3.4

Maus 6 und 7 weisen in den Schnittpräparaten einen 100%igen Befall auf, Maus 3 und 8 zeigen in den Schnittpräparaten einen Befall von 35-40%.

		Gruppe 2 (behandelt)		
		Fläche Niere	Fläche Tumor	% Tumor/Niere
Maus 1	Präparat 1	68,70	21,40	31,10%
	Präparat 2	64,50	1,50	2,30%
	Mittelwert	66,60	11,50	~ 17 %
Maus 4	Präparat 1	81,29	21,10	26,00%
	Präparat 2	69,44	15,68	22,60%
	Mittelwert	75,37	18,39	~ 24 %
Maus 5	Präparat 1	107,40	40,21	37,40%
	Präparat 2	101,48	18,41	18,10%
	Mittelwert	104,40	29,31	~ 28 %
Maus 6	Präparat 1	77,84	13,90	17,90%
	Präparat 2	106,13	24,10	22,70%
	Mittelwert	91,99	19,00	~ 21 %
Maus 8	Präparat 1	94,61	34,47	36,43%
	Präparat 2	94,54	33,11	35,02%
	Mittelwert	94,58	33,79	~ 36 %

Tabelle 3.5

Morphometrische Messungen an Schnittpräparaten sind in der behandelten Gruppe bei 5 Mäusen durchgeführt worden. Bei 4 Mäusen war der prozentuale Tumoranteil geringer als in der unbehandelten Gruppe. In Maus 8 erreichte der prozentuale Anteil 35% und ist damit vergleichbar den geringeren prozentualen Anteilen in der unbehandelten Gruppe.

4 Diskussion

Tiermodelle sind mehr oder weniger geeignet, um das Wachstum menschlicher Tumoren und seine Beeinflussung durch therapeutische Anwendungen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit werden athymische Mäuse untersucht, denen Nierenkrebszellen einer etablierten Zelllinie (A-498) als xenogene Transplantate durch operative Freilegung der Niere unter die Faserkapsel implantiert werden.

Die Verwendung immun-defizienter Mäuse, um menschliche Tumoren wachsen zu lassen, ist seit 1969 etabliert (Kelland 2004). Xenograft-Modelle haben den Nachteil, Mäuse zu verwenden, deren Immunsystem geschwächt ist. Die Rolle des Immunsystems bei der Etablierung und Progression eines Tumors kann deshalb in diesen Modellen nicht beurteilt werden. Dies kann insbesondere bei dem als „immunogen“ bekannten klarzelligem Nierenzellkarzinom bedeutsam sein. Kujawski et al. zeigten 2010, dass modulierte CD8(+) Zellen mit einem Stat3-Defizit eine stärkere antitumoröse Wirkung entwickelten. Sunitinib, das heute häufig zur Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms verwendet wird, blockiert Stat3 in dendritischen und T-Zellen mit konsekutiver Reduktion der primären Tumorgröße. Dies wäre im verwandten Modell nicht zu untersuchen.

Auch Tumor- Stroma- Interaktionen sind wegen der Speziesunterschiede nicht in diesen Modellen zu beurteilen (Céspedes et al. 2006).

Ein ideales Krebsmodell sollte nach dieser Autorengruppe 1. histopathologisch die gleichen Charakteristika aufweisen wie der humane Tumor, 2. die gleichen Schritte der Progression der Erkrankung gehen mit gleichen physiologischen und systemischen Wirkungen, 3. die gleichen Gene und gleiche biochemische Charakteristika bei Initiation und Progression haben, 4. auf eine Behandlung mit gleichwelcher Therapie gleich wie beim Menschen reagieren und 5. therapeutische Wirksamkeit für die Behandlung von Menschen voraussagen können. Diese fünf Forderungen sind nicht immer zu erfüllen und werden im verwandten Tiermodell nur teilweise erreicht.

Die hier verwandte orthotope Transplantation von humanen Nierenkrebszellen eignet sich besser zur Beurteilung einer Metastasierung als die subkutane Implantation (Kelland 2004). Nachteilig im Vergleich zur subkutanen Xenotransplantation ist die notwendige operative Freilegung der Niere in Narkose. Die hier erzielten Ergebnisse zeigen jedoch, dass diese Eingriffe bei 18 Tieren keine nachteiligen Folgen hatten.

Orthotope Modelle sind wenig geeignet, die frühen Phasen der Tumorentstehung, frühe vaskuläre Ereignisse und zelluläre Metastasierung zu untersuchen. Hierzu ist die Intravitalmikroskopie wesentlich besser geeignet, wie unter anderen die Erfahrungen der Göttinger Arbeitsgruppe über Jahre ausführlich gezeigt haben (Heuser et al. 2003 und 2005)

Die Angehrate der verwandten klarzelligen Nierenkarzinomzelllinie A-498 ist aus einem Vorversuch bekannt und betrug dort ~ 60 % (Heuser et al. 2007). Tumorentwicklung wurde in der hier vorgestellten Serie in 9 von 18 Tieren erzielt. Die Untersuchungszeitpunkte lagen in der ersten Serie bei 12 und 16 Wochen, in der jetzigen bei 4 und 8 Wochen nach Implantation der Tumorzellen.

Primäres Ziel der vorgelegten Untersuchungen war der Nachweis, dass die zum Zeitpunkt der Untersuchungen neu eingeführte innovative Flachdetektor-Volumen-Computertomographie (VCT) als nicht-invasives bildgebendes Verfahren im Kleintier geeignet ist zum Nachweis des orthotopen Tumorwachstums und seiner möglichen Metastasierung im Abdomen. Eine Untersuchung der Herz- und Lungenorgane wurde im VCT nicht vorgenommen. Eine mögliche pulmonale Metastasierung wurde durch die Sektion bei Ableben oder beim Ende des Versuchs erkannt.

Der *Gastrin-Releasing-Peptide*-Antagonist RC 3095 stand in der Arbeitsgruppe aus Vorversuchen zur Verfügung. Es sollte deshalb überprüft werden, ob das VCT in Verbindung mit einer geräte-integrierten Volumetrie in der Lage ist, ein Ansprechen der Tumoren auf diese Therapie bildgebend zu dokumentieren.

Das verwandte orthotope Implantationsmodell ist für die Untersuchung der Wirkung des GRP-Antagonisten besser als subkutane Modelle geeignet wegen der besseren Vergleichbarkeit mit dem klinischen Verlauf der Nierentumorerkrankung beim Menschen sowohl lokal als auch im Metastasierungsmuster. Das orthotope Modell ist aus diesen Gründen für die Erforschung der Wirkung von Antitumorsubstanzen im Tierversuch sehr gut geeignet (Céspedes et al. 2006).

Zwei Tiere der Gruppe 1 (unbehandelt) verstarben nach der ersten VCT-Untersuchung. Maus 8 wies eine ausgedehnte Metastasierung auf, der Tod war aller Voraussicht nach dem fortgeschrittenen Tumorleiden geschuldet. Maus 4 wies keinerlei Tumorerkrankung im 1. VCT auf und verstarb 4 Tage nach dem VCT. Ob es sich hier um eine Spätfolge der Narkose oder auch um eine nicht erkannte Infektion handelte, war nicht zu evaluieren.

In der klinischen Medizin bilden die Echtzeit-Ultrasonographie, die Computertomographie und die Kernspintomographie die bildgebenden Verfahren der Wahl, um Patienten mit Veränderungen an den Nieren zu untersuchen. Als beliebig wiederholbare, nicht-belastende Untersuchung darf die Ultrasonographie gelten. Sie kann Tumoren ab einer Größe von ~ 2,5 cm gut darstellen und liquide von soliden Raumforderungen unterscheiden. Sie ist weniger sensibel und genau als die Multislice-Computertomographie (Kang et al. 2012), so dass diese als Bildgebung der ersten Wahl zur Sicherung eines Nierentumors im klinischen Alltag gilt. Die Kernspintomographie mit ihren unterschiedlichen Darstellungsverfahren dient in der Klinik der Beantwortung von Spezialfragen zum Tumor, seiner Umgebung und der Vaskularität.

Für die Untersuchung von Kleintieren sind die Multi-slice-Computertomographen (MSCT) nicht geeignet, da selbst die zum Zeitpunkt der hier vorgestellten Untersuchungen verfügbaren 64-Zeilen-Geräte keine Auflösung unter 0,6 mm erreichen (Heuser et al. 2007, Obenauer et al. 2007 a und b). Knollmann et al. berichteten 2006 erstmals über Erfahrungen mit dem im Institut für Diagnostische Radiologie in Göttingen etablierten Flachdetektor-Volumen-CT (VCT) an Phantomen, Mäusen und Ex-situ-Präparationen des Herzens. In der Folge zeigte der Vergleich von VCT und MSCT zur Volumet-

rie von Lungenmetastasen im Phantom die Überlegenheit des VCT (Obenauer et al. 2007b). In zwei Arbeiten stellten Missbach-Guentner et al. (2007 und 2008) Erfahrungen mit der Darstellung und Ausmessung von Knochenmetastasen eines i.v. injizierten Mammakarzinoms und mit einem orthotopen Mammakarzinom-Xenotransplantat dar.

Der Einsatz des verfügbaren Kleintier-VCT im etablierten orthotopen Nierentumormodell der Nacktmaus war deshalb ein logischer nächster Schritt. Das VCT wurde erfolgreich benutzt zur Evaluation von Osteolysen des ossär metastasierten Mammakarzinoms nach Therapie mit Bevacizumab (Bäuerle et al. 2008) und stellte ein sinnvolles bildgebendes Verfahren dar, mit dem das Ansprechen auf die Behandlung mit anti-angiogenetischen Substanzen zu bestimmen war (Bäuerle et al. 2010).

Erste Erfahrungen mit dem VCT im orthotopen Nierentumormodell wurden in der Göttinger Arbeitsgruppe an 8 Nacktmäusen gewonnen (Heuser et al. 2007). In dieser Serie entwickelten 5 Tiere 6 Nierentumoren, 2 davon waren multilokuläre Tumoren. Eine hepatische Metastasierung wurde im VCT bei einer Maus gesehen. Eine Sicherung dieser Befunde in der Histopathologie post mortem gelang in jedem Fall.

Aufbauend auf diesen Untersuchungen wurde der Versuchsplan für die hier vorgestellten Untersuchungen konzipiert. Im Untersuchungsgut von 18 Tieren entwickelten 9 Tiere orthotope Nierentumoren. Einen bilateralen Befall wiesen 2 Tiere auf, so dass insgesamt 11 von 36 renalen Einheiten Nierentumorentwicklung aufwiesen. Eine hepatische Metastasierung wurde zweimal nachgewiesen. Da sich die VCT-Auswertung auf das Abdomen beschränkte, wurde die subpleurale Metastasierung in einem Tier erst bei Versuchsende durch die histopathologische Aufarbeitung entdeckt. Die Angehrate war im Vergleich zur ersten Serie reduziert. Eingesetzt wurde die gleiche Zellzahl orthotop unter die Nierenkapsel implantierter A-498 Zellen. Das operative Vorgehen und der Einsatz von 0,2 ml der Tumorzellensuspension war in beiden Versuchsserien gleich. Die Abbildung 2.6 zeigt oberhalb des mit einer Pinzette gefassten Nierenunterpols ein blasses Areal, das der flüssigkeitsgefüllten Blase der subkapsulär implantierten Tumorzellsuspension entspricht. Die um ca. 10% reduzierte Angehrate in den jetzigen Versuchen im Vergleich zur ersten Serie

(Heuser et al. 2007) könnte als Varianz der Methode interpretiert werden. Ob alternativ die experimentellen Bedingungen bei der Nierenfreilegung und Implantation der Tumorzellen Ursache dieser Minderung der Angehrate ist, ist nicht zu klären.

Der Zeitpunkt der Untersuchung der Tiere im VCT war in der hier vorgestellten Serie mit 4 und 8 Wochen nach Xenotransplantation früher gewählt als in der ersten Serie (Heuser et al 2007). Dort wurde nach 12 und 16 Wochen untersucht. Der Einsatz des tumorbeeinflussenden GRP-Antagonisten in der Hälfte der Tiere in der jetzigen Serie, ließ die früher geplanten VCT-Untersuchungen als sinnvoll erscheinen.

Im Gesamtkollektiv von 18 Tieren wiesen im ersten VCT nach 4 Wochen 6 Tiere Nierentumoren auf und beim 2. VCT nach 8 Wochen 8 Tiere. Ein Tier mit ausgedehnter lokaler Tumorbildung und Metastasierung verstarb am Tumorleiden vor dem geplanten 2. VCT. 2 Tiere entwickelten einen im VCT nachweisbaren Nierentumor erst nach 8 Wochen.

Die Vorverlegung der VCT- Untersuchungstermine, bedingt durch die Unterteilung in unbehandelte und mit GRP-Antagonist behandelte Tiere, hat sich in Anbetracht der dargestellten Tumorentwicklung und Metastasierung im Vergleich der beiden Serien nicht nachteilig ausgewirkt.

Metastasierung in die Gegenseite und hepatische Absiedlungen sind auch hier seltene Ereignisse. Der Tumornachweis und auch die Metastasierung im Abdomen konnten in allen Fällen sicher mit dem VCT nachgewiesen werden. Es gelang in den zwei aufeinanderfolgenden VCT-Untersuchungen durch ein im Bildbearbeitungssystem integriertes Messverfahren eine CT-gestützte Volumetrie durchzuführen. Sie wies Tumoren mit einer Größe von 0,025-0,4 cm³ nach. Die Tiere waren zwei Gruppen zugeteilt. Eine Gruppe von 9 Tieren blieb unbehandelt. Bei 9 Tieren wurden beginnend mit dem 1. Tag nach Xenotransplantation täglich bis zur Opferung der Tiere subkutane Injektionen des GRP-Antagonisten RC 3095 durchgeführt. So erhielt jedes Tier insgesamt 56 subkutane Injektionen, während entsprechende Placebo-Injektionen in der Kontrollgruppe unterblieben. Der Ceteris-paribus-Regel wurde damit nicht entsprochen. Aus Vorversuchen war jedoch bekannt, dass der Verzicht auf

Scheininjektionen keine Änderung der Tumorangehrate und –größe bewirkte (Heuser et al 2007). So erscheint es als wenig wahrscheinlich, dass die letztendlich beobachtete Reduktion der Tumorgröße in der GRP-Gruppe durch die zweite Variable, nämlich die Injektionen, bewirkt wurde.

Das *Gastrin-Releasing-Peptide* (GRP) wird bei Menschen u.a. von neuroendokrinen Zellen des Antrums freigesetzt und ist einer von mehreren Faktoren, die die Freisetzung von Gastrin fördern und damit die Salzsäurebildung im Magen (Merali et al. 2000). GRP gehört zur Gruppe der Bombesin-ähnlichen Peptide. Diese Peptide wirken generell als Neurotransmitter in der Hirn-Darm-Achse und werden als Wachstumsfaktoren von verschiedenen humanen Karzinomen freigesetzt (Pansky et al. 2000).

Pansky et al. berichteten auch, dass das menschliche Nierenzellkarzinom GRP freisetzt, normale Nierenzellen jedoch nicht. GRP- Rezeptoren fand er in humanen Nierenzellkarzinomzelllinien wie u.a. auch in der hier verwendeten A-498 Zelllinie. Durch den Einsatz von GRP-Antagonisten konnte er zeigen, dass bei der malignen Transformation von menschlichen Nierenzellen zum Nierenzellkarzinom GRP-Rezeptoren neu nachzuweisen sind und richtete das Augenmerk darauf, dass Bombesin-ähnliche Peptide als Mitogene in diesen Karzinomen wirken und deshalb in Diagnostik und Therapie eine Rolle spielen könnten. In späteren Untersuchungen zeigte es sich, dass GRP und GRP-Rezeptoren auch in der nicht-karzinomatösen Niere exprimiert werden (Heuser et al. 2005, Ischia et al. 2014).

Heuser berichtete aus der eigenen Arbeitsgruppe über Ergebnisse intravitalmikroskopischer Untersuchungen an Tumorsphäroiden des Nierenzellkarzinoms implantiert in die dorsale Rückenhautkammer unter Verwendung des GRP-Antagonisten RC 3095. Er konnte erstmals eine proangiogene Wirkung des GRP nachweisen. In immun-histochemischen und Laser-Scan-mikroskopischen Untersuchungen konnte er den GRP-Rezeptor in Tumorzellen aber auch in normalen Nierenzellen nachweisen. Neue Ergebnisse dieser Untersuchungen waren die Wirkung des GRP auf die Mikrogefäßstruktur der Tumorsphäroide und ihre Beeinflussung durch den GRP-

Antagonisten. Eine Beeinflussung der VEGF-Sekretion konnte in diesen Versuchen nicht nachgewiesen werden (Heuser et al. 2005).

Diese Erfahrungen der Göttinger Arbeitsgruppe führten in den vorliegenden Untersuchungen neben der schon dargestellten Überprüfung des orthotopen Maus-Nierentumormodells durch nicht-invasive VCT-Untersuchungen dazu, die aus den intravitalmikroskopischen Untersuchungen bekannte Beeinflussung von Nierentumoren durch den GRP-Antagonisten RC 3095 ebenfalls zu prüfen. Es sollte nachgewiesen werden, ob eine Beeinflussung des Tumors im Sinne reduzierter Tumorangehrate und einer Größenminderung sich entwickelnder Tumoren der Niere in diesem Tiermodell eintritt und wenn ja, ob diese durch das VCT bildgebend darzustellen ist. Die Kontrolle erfolgte dann durch post-mortem durchgeführte Histologie und Morphometrie der Schnittpräparate bei Versuchsende.

Im Vergleich der unbehandelten und behandelten Gruppe zeigt es sich, dass die Tumorangehrate in beiden Gruppen praktisch vergleichbar ist. Man kann daraus wohl schließen, dass RC 3095 nicht geeignet erscheint, eine Tumorentwicklung des Xenotransplantates zu verhindern. Bedenken muß man bei dieser Aussage andererseits die hier vorgestellte kleine Zahl der Versuchstiere, so dass man insgesamt sicherlich nur von einer Pilotstudie sprechen kann und das Ergebnis an einer größeren Zahl von Tieren gesichert werden müsste.

Das VCT ist sehr gut geeignet, die Tumoren in beiden Gruppen darzustellen. Die Sektionen zeigten, dass keine Tumorentwicklung übersehen wurde. Die Volumetrie unbehandelter und behandelter Tiere zeigte das Wachstum z.B. in Maus 3 von 0,023 auf 0,14 cm³ in den konsekutiven VCT's. Alle Tumoren, die sich entwickelten, sind schon im ersten VCT nach 4 Wochen nachweisbar. In der behandelten Gruppe traten nach 4 Wochen nur zwei kleine Tumoren auf, nach 8 Wochen 5 Tumoren, die nur in Maus 8 ein Volumen vergleichbar dem in der unbehandelten Gruppe erreichte.

Der GRP-Antagonist bewirkte nach diesen Ergebnissen ein langsames Angehen und Wachstum der Xenotransplantate, die im VCT gut darzustellen und auch zu messen waren.

Die pathohistologische Untersuchung zeigte die klarzellige Differenzierung der orthotopen Xenotransplantate. Die Morphometrie der Schnittpräparate ließ in der unbehandelten Gruppe am Ende des Versuches Tumoren erkennen, die bis zu 100% des Schnittpräparates ausmachten, während in der behandelten Gruppe Tumoranteile über 35 % im Mittel nicht ausgemessen wurden. Die Schnittebene war jeweils ein Längsschnitt durch das Maximum der Nierentumorentwicklung. Auch diese *post mortem* Kontrolle ließ den Effekt der GRP-Antagonisten -Behandlung erkennen und stand in Einklang mit den *in vivo* durchgeführten VCT- Volumetrie Ergebnissen. Eine Volumetrie der Lebermetastasierung wurde nicht durchgeführt.

Innerhalb der letzten 15 Jahre hat man mit vielfältigen Möglichkeiten versucht, den Wachstum fördernden Effekt von GRP zu hemmen. Die Entwicklung von unterschiedlichen Antagonisten, monoklonalen Antikörpern, Vaccinationen gegen GRP, Antisense-Oligonukleotiden gehören dazu (Hohla und Schally 2010). RC 3095 ist ein GRP-Antagonist, der der Arbeitsgruppe seit Jahren zur Verfügung steht. Seine Tumor-hemmende Wirkung scheint nicht nur auf der kompetitiven Hemmung am Rezeptor zu bestehen, ist aber auch heute noch nicht vollständig verstanden. RC 3095 wirkt an den kleinen, neugebildeten Gefäßen und könnte deshalb Wachstumsfaktoren der Neoangiogenese negativ beeinflussen, auch wenn eine Wirkung auf VEGF von Heuser et al. 2005 in der Maus nicht nachgewiesen werden konnte. Das gewachsene Verständnis der Genetik und molekularen Biologie des Nierenzellkarzinoms hat zur Entwicklung von Medikamenten geführt, die Wachstumsfaktoren und Signalwege beeinflussen. Sechs Medikamente sind bisher zur Behandlung des menschlichen, metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen. Vier Medikamente (Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib und Bevacizumab) hemmen Tumorangiogenese durch Blockade von VEGF. Zwei Medikamente (Temsirrolimus und Everolimus) entwickeln Antitumoreffekte durch Hemmung von mTOR (Voss et al. 2011). In klinischen Studien bewirken diese Medikamente eine lebensverlängernde Wirkung, sie führen nicht zur einer Heilung des Tumorleidens, sie hemmen die Größenzunahme und die Metastasierung nicht vollständig, vermutlich weil nur einzelne Schritte in dem multifaktoriell bewirkten Krebswachstum beeinflusst werden (Fernandez et al. 2006) und weil

der Tumor Resistenzentwicklungen gegen die eingesetzten Medikamente zeigt (Voss et al. 2011). Eine Zielrichtung zur Überwindung von Resistenz kann die Beeinflussung von Hormonrezeptoren sein, wie die Untersuchungen von Keller et al. (2005) mit einem zytotoxischen Doxorubicin/Bombesin-Rezeptor-Analog experimentell nachweisen konnten. Auch unsere Tierversuche ermutigen zu einem Versuch der Beeinflussung des metastasierten Nierenzellkarzinoms beim Menschen. Schwartzmann et al. (2007) haben in einer Phase1-Studie an 25 Patienten nachweisen können, dass in dieser Dosis-Eskalationsstudie außer lokalen Hautreizungen an den Injektionsstellen keine Nebenwirkungen auftreten. Eine Beeinflussung unterschiedlicher Tumoren trat allerdings nicht ein.

Die Auswahl einer optimalen Reihenfolge bisher verfügbarer Medikamente zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms richtet sich bis heute nach den Erfahrungen des Behandlers, der unterschiedlichen Toxizität der Substanzen, dem Zustand und den Wünschen des Patienten (Escudier et al. 2013, Heng et al. 2014, Porta et al. 2012, Sonpavde et al. 2012). Neue Substanzen, die andere Wege als die etablierten einschlagen, werden weltweit untersucht. Ein Ziel kann deshalb sicherlich die Beeinflussung von Peptidrezeptoren sein, wenn diese von Tumoren exprimiert werden (Reubi 2013). Ischia et al. (2014) unterstreichen die Bedeutung von GRP und GRP-Rezeptor in Tumoren des urologischen Fachgebietes (insbesondere Niere und Prostata) und unterstützen damit die Sinnhaftigkeit weiterer Peptidrezeptorforschung in der Zukunft.

5 Zusammenfassung

Nierentumoren sind heute immer noch, trotz des Einsatzes neuer Medikamente, im metastasierten Stadium schwer zu behandeln und haben eine ungünstige Prognose. Es macht deshalb Sinn, im Tiermodell neue Wege der Therapie zu untersuchen.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen insgesamt, dass

- 1) das orthotope Nierentumormodell in der Nacktmaus reproduzierbar etabliert werden kann.
- 2) die Flachdetektor-Volumen-Computertomographie (fpVCT) ein innovatives und nicht invasives Verfahren zur Diagnose und zum Staging des Nierentumors in kleinen Mäusen darstellt. Schon 4 Wochen nach der Implantation kann man die Tumoren im VCT bildgebend darstellen und ausmessen. Darüber hinaus erweist sich das VCT als sehr zuverlässig. Die *post mortem* Histologie konnte nachweisen, dass keine Tumorentwicklung im VCT übersehen wurde. Auch wurden keine falsch-positiven VCT-Befunde erhoben.
- 3) im Vergleich unbehandelter und durch GRP-Antagonist behandelter Tiere eine Reduktion der Tumorgroße durch das VCT in Verlaufsuntersuchungen bestimmt werden kann.
- 4) der GRP-Antagonist RC 3095 die Entstehung des Nierentumors nicht verhindern kann. Die Angehrate ist in den zwei Gruppen gleich.
- 5) der GRP-Antagonist 3095 das Tumorwachstum verzögert. In der behandelten Gruppe sind insgesamt kleinere Tumoren und zu einem späteren Zeitpunkt beobachtet worden.
- 6) eine Metastasierung in beiden Tiergruppen selten beobachtet wird. Tritt sie auf, waren in den unbehandelten Mäusen die Metastasen häufiger und ausgeprägter.

6 Literaturverzeichnis

- Atzpodien J, Kirchner R, Illiger HJ, Metzner B, Ukena D, Schott H, Funke PJ, Gramatzki M, von Jürgenson S, Wandert T et al. (2001): Il-2 combination with IFN- α and 5-FU versus tamoxifen in metastatic renal cell carcinomas: long-term results of a controlled randomized clinical trial. *Brit J Cancer* 85, 1130-36
- Baron VT, Welsh J, Abedinpor P, Borgström P (2011): Intravital microscopy in the mouse dorsal chamber model for the study of solid tumors. *Am J Cancer Res* 1(5), 674-86
- Bäuerle T, Hilbig H, Bartling S, Kiessling F, Kersten A, Schmitt-Graff A, Kauczor HU, Delorme S, Berger MR (2008): Bevacizumab inhibits breast cancer-induced osteolysis, surrounding soft tissue metastasis and angiogenesis in rats as visualised by VCT and MRI. *Neoplasia* 10, 511-520
- Bäuerle T, Bartling S, Berger M, Schmitt-Graff A, Hilbig H, Kauczor HU, Delorme S, Kiessling F (2010): Imaging anti-angiogenic treatment response with DCE-VCT, DCE-MRI, and DWI in an animal model of breast cancer bone metastasis. *Eur J Radiol* 73, 280-287
- Bedke J, Hemmerlein B, Perske C, Gross A, Heuser M (2010): Tumor-associated macrophages in clear cell renal cell carcinoma express both gastrin-releasing peptide and its receptor: a possible modulatory role of immune effectors cells. *World J Urol* 28,335-341
- Beerling E, Ritsma L, Vrisekoop N, Derksen PW, van Rheenen J (2011): Intravital microscopy: new insights into metastasis of tumors. *J Cell Sci.* 124, 299-310
 Bepler G, Rotsch M, Jaques G, Haeder M, Heymanns J, Hartogh G, Kiefer P, Havemann K (1988): Peptides and

growth factors in small cell lung cancer: production, binding sites, and growth effects. *J Cancer Res Clin Oncol* 114, 235-244

- Bichler KH, Wechsel HW (1999): The problematic nature of metastasized renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 19, 1463-1466
- Céspedes MV, Casanova I, Parreno M, Manges R (2006): Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol* 8, 318-319
- Chan DY, Marshall FF (1998): Surgery in advanced and metastatic renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 8, 369-373
- Chow WH, Dong LM, Devesa SS (2010): Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol* 7, 245-257
- Coppin C, Kollmannsberger C, Le L, Porzsolt F, Wilt TJ (2011): Targeted therapy for advanced renal cancer (RCC): a Cochrane systematic review of published randomized trials. *BJU Int.* 108, 1556 -63
- Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G (2007): Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 18, 1457-1466
- DiLorenzo G, Porta C, Bellmunt J, Sternberg C, Kirkali Z, Staehler M, Joniau S, Montorsi F, Buonerba C (2011): Toxicities of Targeted Therapy and Their Management in Kidney Cancer. *Eur Urol*, 59, 526-540
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM (2007a): Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356, 125-134

- Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A, Moore N (2007b): Bevacizumab plus interferon alpha-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* 370, 2103-2111
- Escudier B, Szczylik C, Hutson TE, Demkow T, Staehler M, Rolland F, Negrier S, Laferriere N, Scheuring UJ, Cella D et al. (2009): Randomized Phase II Trial of first-line treatment with sorafenib versus interferon alfa2a in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JCO* 27, 1280-1289
- Escudier B, Albiges L, Sonpavde G. (2013): Optimal management of metastatic renal cell carcinoma: current status. *Drugs* 73, 427-38
- Fernandez E, Gallus S, La Vecchia C (2006): Nutrition and cancer risk: an overview. *J Br Menopause Soc* 12, 139-142
- Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, Tangen C, Van Poppel H, Crawford ED (2004): Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. *J Urol* 171, 1071-6
- Heng DY, Signorovitch J, Swallow E, Li N, Zhong Y, Qin P, Zhuo DY, Wang X, Park J, Stergiopoulos S et al. (2014): Comparative effectiveness of second-line targeted therapies for metastatic renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis of real-world observational studies. *PLOS one* DOI: 10.1371-0114264
- Heuser M, Pfaar O, Gralla O, Grone HJ, Nustede R, Post S (2000): Impact of gastrin-releasing peptide on intestinal microcirculation after ischemia-reperfusion in rats. *Digestion* 61, 172-180

- Heuser M, Ringert RH, Zoeller G, Hemmerlein B (2003): Dynamic assessment of angiogenesis in renal cell carcinoma spheroids by intravital microscopy. *J Urol* 169, 1267-70
- Heuser M, Schlott T, Schally AV, Kahler E, Schliephake R, Laabs SO, Hemmerlein B (2005): Expression of gastrin releasing Peptide receptor in renal cell carcinomas: a potential function for the regulation of neoangiogenesis and microvascular perfusion. *J Urol* 173, 2154-2159
- Heuser M, Hemmerlein B, Püsken M, Koskinas N, Dullin C, Gross AJ, Zöller GM, Obenauer S (2007): Determination of renal carcinoma progression in small animals by means of flat-panel volumetric computer tomography. *Urologe A* 46, 1710-1714
- Hohla F, Schally AV (2010): Targeting gastrin releasing peptide receptors: New options for the therapy and diagnosis of cancer. *Cell Cycle* 9, 1738-41
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ (2007): Temsirolimus, interferon alpha or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356, 2271-2281
- Ischia J, Patel O, Bolton D, Shulkes A, Baldwin GS (2014): Expression and function of gastrin-releasing peptide (GRP) in normal and cancerous urological tissues. *BJU Int. Suppl* 2:40-7 doi: 10.1111/bju.12594
- Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya RV (2008): International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev* 60, 1-42

- Kang SK, Chandarana H (2012): Contemporary imaging of the renal mass. *Urol Clin N Amer* 39, 161-70
- Kato M, Suzuki T, Suzuki Y et al. (2004): Natural history of small renal cell carcinoma: evaluation of growth rate, histological grade, cell proliferation and apoptosis. *J Urol* 172, 863-866
- Kelland LR (2004): "Of mice and men": values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40, 827-836
- Keller G, Schally AV, Nagy A, Halmos G, Baker B, Engel JB (2005): Targeted chemotherapy with cytotoxic bombesin analogue AN-215 can overcome chemoresistance in experimental renal cell carcinomas. *Cancer* 104, 2266-2274
- Knollmann F, Valencia R, Buhk JH, Obenauer S (2006): Characteristics and applications of a flat panel computer tomography system. *Rofo* 178, 862-871
- Kujawski M, Zhang C, Herrmann A, Reckamp K, Scuto A, Jensen M, Deng J, Forman S, Figlin R, Yu H (2010): Targeting STAT3 in adoptively transferred T cells promotes their in vivo expansion and anti-tumor effects. *Cancer Res* 70, 9599-9610
- Lane BR, Novick AC (2007): Nephron-sparing surgery. *BJU* 99, 1245-1250
- Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PF, Patard JJ, Sinescu IC, European Association of Urology Guideline Group for renal cell carcinoma (2007): Renal cell carcinoma guidelines. *Eur Urol* 51, 1502-1510

- Ljungberg B, Bensalah K, Bex A, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, Kuczyk MA, Lam T, Marconi L et al. (2014): Guidelines on renal cell carcinoma. EAU guidelines.
- Marten K, Dullin C, Machann W, Schmid JS, DAS M, Hermann KP, Engelke C (2009): Comparison of flat-panel-detector-based CT and multidetector-row CT in automated volumetry of pulmonary nodules using an anthropomorphic chest phantom. *Br J Radiol* 82, 716-723
- Merali Z, McIntosh J, Anisman H (2000): Role of Bombesin related peptides in the control of food intake. *Neuropeptides* 33, 376-386
- Missbach-Guentner J, Dullin C, Zientkowska M, Domeyer-Missbach M, Kimmina S, Obenauer S, Kauer F, Stühmer W, Grabbe E, Vogel WF, Alves F (2007): Flat-panel detector-based volume computed tomography: a novel 3D imaging technique to monitor osteolytic bone lesions in a mouse tumor metastasis model. *Neoplasia* 9, 755-765
- Missbach-Guentner J, Dullin C, Kimmina S, Zientkowska M, Domeyer-Missbach M, Malz C, Grabbe E, Stühmer W, Alves F (2008): Morphologic changes of mammary carcinomas in mice over time as monitored by flat-panel detector volume computed tomography. *Neoplasia* 10, 663-673
- Morisset J, Morisset S, Lauzon K, Cote S, Laine J, Bourassa J, Lessard M, Echave V (2000): Pancreatic inflammation, apoptosis, and growth: sequential events after pancreatectomy in pigs. *Pancreas* 21, 321-324
- Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J (1999): Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 17, 2530-40

- Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G et al. (2006): Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24, 16-24
- Motzer RJ, Hutson T et al. (2007a): Sunitinib versus Interferon Alpha in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 356, 115-124
- Motzer RJ, Michaelson MD, Rosenberg J, Bukowski RM, Curti BD et al. (2007b): Sunitinib efficacy against advanced renal cell carcinoma. *J Urol* 178, 1883-1887
- Mourad WF, Dutcher J, Ennis RD (2014): State-of-the-art management of renal cell carcinoma *Am J Clin Oncol* 37, 498-505
- Neukamm M, Palmowski M, Bartling S, Schawo S, Rietdorf U, Meinzer HP, Hohenfellner M, Kauczor HU, Hallscheidt P (2009): Intrarenal artery delineation with ultra high resolution, flat panel based, volume computerized tomography: outer limits of spatial resolution. *J Urol* 182, 2915-2919
- Nishi S, Seino Y, Takemura J, Ishida H, Seno M, Chiba T, Yanaihara C, Yanaihara N, Imura H (1985): Vagal regulation of GRP, gastric somatostatin, and gastrin secretion in vitro. *Am J Physiol* 248, 425-431
- Obenauer S, Dullin C, Alves F, Missbach-Guentner J, Grabbe E, Heuser M (2007a): Flat-panel-detector-based volumetric CT: performance evaluation of imaging for skeletal structures of small animals in comparison to multislice CT. *Clin Imaging* 31, 18-22
- Obenauer S, Dullin C, Heuser M (2007b): Flat panel detector-based volumetric computed tomography (fpVCT): performance evaluation of volumetric methods by using different phantoms in comparison to 64-multislice computed tomography. *Invest Radiol* 42, 291-296

- Pansky A, De Weerth A, Fasler-Kan E, Boulay JL, Schulz M, Ketterer S, Selck C, Beglinger C, Von Schrenck T, Hildebrand P (2000): Gastrin releasing peptide-preferring bombesin receptors mediate growth of human renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 11, 1409-1418
- Pattard JJ, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guillé F, Lobel B (2002): Prognostic significance of the mode of detection in renal tumours. *BJU* 90, 358-363
- Porta, C, Tortora G, Linnassier C, Papazisis K, Awada A, Berthold D, Maroto JP, Powles T, De Santis M. (2012): Maximising the duration of disease control in metastatic renal cell carcinoma with targeted agents: an expert agreement. *Med Oncol.* 29, 1896-907
- Reubi JC (2013): Old and new peptide receptor targets in cancer: future directions. *Rec Res Cancer Res* 194, 567-76
- Robson CJ, Churchill BM, Anderson W (1969): The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 101, 297-301
- Roos FC, Steffens S, Junker K, Janssen M, Becker F, Wegener G, Brenner W, Steinestel J, Schnoeller TJ, Schrader M et al. (2014): Survival advantage of partial over radical nephrectomy in patients presenting with localized renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 14, 372-379
- Russo P (2010): Multi-modal treatment for metastatic renal cancer: the role of surgery. *World J Urol* 28, 295-301
- Schally AV (2008): New approaches to the therapy of various tumors based on peptide analogues. *Horm Metab Res* 40, 315-322
- Schally AV, Nagy A (2003): New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin. *Life Sci* 72, 2305-2320

- Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, Schunemann D, Cancelli A, Pereira AS, Richter M, Souza F, da Rocha AB, Souza FH et al. (2006): A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 24, 403-412
- Sonpavde G, Choueiri TK, Escudier B, Ficarra V, Hutson TE, Mulders PF, Patard JJ, Rini BI, Staehler M, Sternberg CN, Stief CG (2012): Sequencing of agents for metastatic renal cell carcinoma: can we customize therapy? *Eur Urol* 61, 307-16
- Steinbach F, Stöckle M, Hohenfellner R (1995): Clinical experience with nephron-sparing surgery in the presence of a normal contralateral kidney. *Semin Urol Oncol* 13,288-91
- Störkel S, Thoenes W, Jacobi GH, Engelmann U, Lippold R (1990): Prognostic parameters of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 18, 36-37
- Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K (1997): Classification of renal carcinoma. *Cancer* 80, 987-989
- Sunela K, Lehtinen ET, Kataja MJ, Kujala PM, Soimakallio S, Kellokumpu-Lehtinen (2014): Development of renal cell carcinoma (RCC) diagnostics and impact on prognosis. *BJU Int* 113,228-35
- Thoenes W, Störkel S (1991): Pathology of benign and malignant renal cell tumors. *Urologe A* 30, W41-50
- Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ (1986a): Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res Pract* 181, 125-143

- Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ, Jacobi GH (1986b): Renal cell carcinoma – a classification based on cytomorphological criteria. Zentralbl Allg Pathol 132, 503-513
- Thoenes W, Rumpelt HJ, Störkel S (1990a): Classification of renal cell carcinoma/tumors and their relationship to the nephron-collecting tubules system. Klin Wochenschr 68, 1102-1111
- Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ, Moll R (1990b): Cytomorphological typing of renal cell carcinoma – a new approach. Eur Urol 18, 6-9
- Thrasher JB, Paulson DF (1993): Prognostic factors in renal cancer. Urol Clin North Am 20, 247-262
- Voss MH, Molina AM, Motzer RJ (2011): mTOR inhibitors in advanced renal cell carcinoma. Hematol Oncol Clin North Am 25,835-52
- Xiao D, Qu X, Weber HC (2003): Activation of extracellular signal-regulated kinase mediates bombesin-induced mitogenic responses in prostate cancer cells. Cell Signal 15, 945-953
- Yegen BC (2003): Bombesin-like peptides: candidates as diagnostic and therapeutic tools. Curr Pharm Des 9, 1013-1022
- Zhang T, Schulze D, Xu X, Kim J (2009): Tetrahedron beam computed tomography (TBCT): a new design of volumetric CT system. Phys Med Biol 54, 3365-3378

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Heuser danke ich für die Überlassung des Themas, die Einführung in das Tiermodell, seine immer wieder konstruktiven Vorschläge während der Experimentierphase sowie für die fachliche Beratung bei der Erstellung der Dissertationsarbeit.

Herrn Dr. S. Laabs danke ich für die Hilfe bei der operativen Etablierung des Tiermodells. Herrn Dr. Schunk und seinen Mitarbeitern aus der Tierexperimentellen Abteilung danke ich ebenso für die Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. E. Grabbe danke ich dafür, dass er mir den Zugang zu dem innovativen Kleintier-Volumen-CT ermöglichte. Den Mitarbeitern der Abteilung Diagnostische Radiologie, insbesondere Herrn Dr. Psychogios, danke ich für die Unterstützung bei der Bildgewinnung und –auswertung.

Herrn PD Dr. P. Thelen aus dem Bereich der experimentellen Urologie danke ich für die Einführung in und Unterstützung bei zellulären und molekularen Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. B. Hemmerlein danke ich ganz besonders für die pathohistologische Bearbeitung und Beurteilung der entnommenen Tierorgane und die Einführung in die Methodik der Morphometrie.

Herrn Prof. Dr. R.-H. Ringert danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit, meine urologische Fachweiterbildung durchführen zu können, für die konstruktiven Vorschläge im Rahmen dieses Promotionsvorhabens, für die fachliche Beratung bei der Erstellung meiner Dissertationsarbeit und für die Übernahme ihrer Vertretung.

Lebenslauf

Als Sohn des Urologen Dr. med. Spyros Koskinas und seiner Frau Despina Koskina wurde ich, Nikolaos Koskinas, am 25. Juli 1979 in Athen, Griechenland geboren. Ich bin griechischer Staatsbürger.

Ich lebe seit meiner Geburt auf Korfu.

Von 1985-1991 besuchte ich die 2. Grundschule auf Korfu und von 1991-1994 das 2. Gymnasium und von 1994-1997 das 2. Lykeion.

1997 erhielt ich das Abiturzeugnis mit der Gesamtnote 19,81 / 20 und damit die Hochschulreife.

Im Herbst 1997 nahm ich nach erfolgreichen Aufnahmeprüfungen das Studium der Biologie an der Universität Athen auf. Im Herbst 1998 habe ich nach erneuten erfolgreichen Prüfungen angefangen, Humanmedizin an der medizinischen Schule der Universität Athen zu studieren. Für die gesamte Studienzeit habe ich nach erfolgreichen Prüfungen das Stipendium „Papadakis“ bekommen. Im August 2004 habe ich mein Medizinstudium mit der Gesamtnote „sehr gut“ 8,1/10 abgeschlossen und die Approbation als Arzt erhalten. Nach Beantragung habe ich im November 2004 die deutsche Approbation erhalten. Von Oktober 2004 bis April 2010 war ich als Assistenzarzt in der Urologischen Klinik der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.med. R.-H. Ringert tätig. Im November 2009 habe ich nach mündlicher Prüfung in Hannover die Fachqualifikation eines Facharztes für Urologie erreicht.

Von Mai 2010 bis Februar 2011 habe ich meinen Wehrdienst als Urologe im griechischen Militär geleistet (412 Militärisches KH in Xanthi).

Seit Februar 2011 bis heute arbeite ich auf Korfu als niedergelassener Urologe in einer Gemeinschaftspraxis mit meinem Vater. Im Juni 2012 absolvierte ich erfolgreich die Prüfung des European Board of Urology, deren „Fellow“ ich seit dieser Zeit bin (FEBU).

Ich bin seit September 2012 mit Androniki Dellarta verheiratet. Unsere Kinder Despina und Spyros wurden 2013 und 2014 geboren.

Im Oktober 2005 begann ich mit den experimentellen Arbeiten in dem Promotionsvorhaben, das von den Herren Professoren Heuser und Ringert betreut wurde.