

**Die Evaluierung der Hypoxie bedingten  
Wachstumsfaktoren im Urothelkarzinom in einem  
Tiermodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Georg Müller  
aus Irkutsk/Russland

2010

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller
2. Gutachter: PD Dr. med. Nico Schäfer

Tag der Mündlichen Prüfung:  
17.06.2010

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
1.1 EINFÜHRUNG .....	6
1.2 DAS HARNBLASENKARZINOM .....	7
1.2.1 Inzidenz und Epidemiologie.....	7
1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	8
1.2.3 Pathologie, Tumorentstehung, Stadieneinteilung.....	9
1.2.4 Klinik und Symptomatik .....	13
1.2.5 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms .....	13
1.2.6 Differenzialdiagnose .....	14
1.2.7 Therapie .....	15
1.2.7.1 Therapie von nicht-invasiven (pTa-1, G1-2) und High-Risk-Karzinomen (pTa-1 G3, Cis). .....	15
1.2.7.2 Therapie des muskelinvasiven Karzinoms (pT2-4, Nx, M0) .....	16
1.2.7.3 Stellenwert der systemischen Chemotherapie bei metastasiertem Urothelkarzinom.....	17
1.2.7.3.1 Neoadjuvante systemische Chemotherapie.....	17
1.2.7.3.2 Adjuvante Chemotherapie.....	18
1.2.8 Prognose .....	20
1.2.9 Alternativen der Chemotherapie beim metastasiertem Urothelkarzinom .....	21
1.3 DIE GEWEBSOXYGENIERUNG .....	22
1.3.1 Oxygenierung im gesunden Gewebe .....	22
1.3.2 Gewebsoxygenierung und Tumorangio-genese.....	24
1.3.3 Pro- und Antiangiogenetische Faktoren .....	26
1.3.3 Induktion der Angiogenese durch die Gewebshypoxie .....	29
1.4 FRAGESTELLUNG .....	30
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>31</b>
2.1 STUDIENDESIGN .....	31
2.1.1 Erster Vorversuch: Erzeugung einer steuerbaren und messbaren Gewebshypoxie in einem Tiermodell.....	31
2.1.2 Zweiter Vorversuch: Erzeugung eines orthotopen subkutanen Tumormodell bei der Rate, Bestimmung der optimalen Tumorzellzahl.....	31
2.1.3 Hauptversuch .....	32

2.2 MATERIALIEN.....	33
2.2.1 Versuchstiere.....	33
2.2.2 Tumorzellen.....	34
2.2.3 Verwendete Substanzen .....	36
2.2.3.1 Rekombinantes humanes Erythropoetin (rhEPO).....	36
2.2.4 Verwendete Geräte .....	36
2.2.4.1 Narkosegerät .....	36
2.2.4.2 LEA O <sub>2</sub> C (Oxygen to see) .....	37
2.3 METHODEN .....	38
2.3.1 Anästhesie.....	38
2.3.2 Blutabnahme und Messung von Blutparametern .....	38
2.3.3 Ganzkörperbestrahlung.....	40
2.3.4 Die Therapie mit Erythropoetin.....	40
2.3.5 Tumorzelleninjektion (NBT-II).....	41
2.3.6 Tumolvolumenmessung.....	41
2.3.7 Messprinzip des O <sub>2</sub> C, Messung der O <sub>2</sub> -Sättigung im Tumor und im subkutanen Gewebe .....	41
2.3.8 Tötung und Sektion der Ratten.....	42
2.3.9 Histologie.....	43
2.3.10 Immunhistochemie.....	43
2.3.10.1 Immunhistochemische Färbung.....	43
2.3.10.2 Auswertung .....	44
2.3.11 Quantitative Bestimmung des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) im Serum mittels Sandwich-ELISA.....	44
2.3.11.1 Prinzip des Sandwich-ELISA (Enzymimmunoassay).....	44
2.3.11.2 Durchführung .....	45
2.3.12 Statistische Analyse.....	46
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
3.1 ERGEBNISSE DER VORVERSUCHE .....	47
3.1.1 Erster Vorversuch.....	47
3.1.2 Zweiter Vorversuch.....	49
3.2 ERGEBNISSE DES HAUPTVERSUCHES .....	51

3.2.1 Tumorwachstum .....	51
3.2.2 Erniedrigte Hb-Werte und Hypoxie (perkutane Messungen), Behandlung mit EPO .....	52
3.2.2.1 Der Hämoglobingehalt .....	52
3.2.2.2 O <sub>2</sub> -Sättigung im gesunden Gewebe und Tumorgewebe .....	54
3.2.2.3 Radiogene Leukopenie .....	55
4.3 DIE MESSUNG DER KONZENTRATION DES VEGF´S IM SERUM .....	56
3.2.3 Die Messung der Konzentration des VEGF´S im Serum .....	56
3.2.4 Immunhistochemische Bestimmung des HIF´S und des VEGF´S.....	57
3.2.4.1 HIF-1 Alpha.....	57
3.2.4.2 VEGF .....	57
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>60</b>
4.1 STEUERBARES ANÄMIEMODELL BEI DER RATTE .....	60
4.2 ORTHOTOPES SUBKUTANES TUMORMODELL .....	61
4.3 MESSBARKEIT DER HYPOXIE IM TIERMODELL, VERGLEICH DER MESSMETHODEN .....	62
4.4 OXYGENIERUNGSTATUS DER GEWEBEN, ABKLÄRUNG VON THERAPIE MIT EPO .....	62
4.5 HYPOXIE BEDINGTE ÜBEREXPRESSION VON HIF-1 $\alpha$ UND VEGF´S IM UROTHEL-KARZINOM .....	63
4.6 AUSWIRKUNGEN DER HYPOXIE UND DER BEHANDLUNG MIT EPO AUF DAS TUMORWACHSTUM .....	63
4.7 EINFLUSS DER HÄMOGLOBINKONZENTRATION UND IMMUNITÄTSSTATUS AUF VERHALTEN DES UROTHEL-KARZINOMS IN UNSEREM TIERMODELL .....	64
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>66</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
<b>7. DANKSAGUNG.....</b>	<b>84</b>
<b>8. LEBENS-LAUF.....</b>	<b>85</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Einführung

Die Prognose des lokal fortgeschrittenen und metastasierten Transitionalzellkarzinoms ist heutzutage immer noch limitiert. Trotz neuester Therapiekonzepte beträgt die 5-Jahres Überlebensrate 16,5 – 20%. Zwar sind die aktuelle chemotherapeutische Strategien vielversprechend, jedoch wird die eigentliche Effizienz der Therapie durch toxische Nebenwirkungen limitiert (Artz A et al., 2005; Tinker A et al., 2006).

Neue Kenntnisse der Tumorzellbiologie lassen an neue Konzepte denken, die statt einer radikalen „Ausrottung“ eine Kontrolle der malignen Neoplasien bei guter Lebensqualität des Patienten ermöglichen. Hohe Prioritäten werden dem Entschlüsseln der Mechanismen der intrazellulären Kommunikation und den Funktionen der Zellrezeptoren beigemessen. Jüngste Studien zeigen, dass verschiedene Antikörper oder Rezeptorantagonisten das Tumorwachstum bzw. die Angiogenese hemmen oder selbst Apoptose aktivieren können (Dominguez-Escrig JL et al., 2004; Kassouf W et al., 2005; Rocchetti R et al., 2005).

Geringe Veränderungen im Mikromilieu der Tumorzellen können starke Auswirkungen auf den Zellzyklus, das Wachstum und die Invasivität haben. Beispielsweise kann eine Verminderung des Sauerstoffpartialdrucks im Tumorgewebe die Expression des Hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) induzieren (Vaupel P und Harrison L, 2004). Infolgedessen steigt die Synthese von mehreren Wachstumsfaktoren wie Vascular endothelial growth factor (VEGF), Epidermal growth factor (EGF) und insulin-like growth factor 2 (IGF-2) (Phillips RJ et al., 2005; Pore N et al., 2006). Die Rolle dieser Faktoren in verschiedenen Tumorarten und darausfolgende Therapieoptionen werden zur Zeit intensiv erforscht (Bellezza I et al., 2006; Roberts N et al., 2006).

Es ist bekannt, dass insbesondere schlecht differenzierte Subtypen des Transitionalzellkarzinoms (TCC) empfindlich gegenüber Hypoxie sind. Palit et al. haben in einer Studie gezeigt, dass bei Patienten mit Blasenkarzinom eine erhöhte Expression von HIF's-1 $\alpha$  mit dem Rezidivrisiko stark korrelieren (Palit V et al., 2005). Theodoropoulos et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen HIF - 1 $\alpha$  und einer Progression des TCC's. Dabei wurde festgestellt, dass die Überexpression des HIF's-1 $\alpha$

kombiniert mit der Akkumulation des abberanten p53-Proteins einen aggressiven Phänotyp des Tumors kennzeichnen und damit wahrscheinlich zukünftige Progression voraussagen (Theodoropoulos VE et al., 2005) kann. Somit erscheint die Verhinderung einer Tumorphoxie therapeutisch relevant.

Eine häufige Nebenwirkung der Chemotherapie beim lokal fortgeschrittenen und/oder metastasierten Blasenkarzinom ist jedoch eine myelotoxische Anämie. Hieraus resultiert eine Gewebeshypoxie (Bamias A et al., 2006a; von der Maase H et al., 2005). Mehrere vorklinische Studien haben bereits den Nutzen der Korrektur dieser Anämie z.B. durch die Gabe von Erythropoietin (EPO) gezeigt.

## 1.2 Das Harnblasenkarzinom

### 1.2.1 Inzidenz und Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom nimmt den vierten Platz unter anderen Tumoren hinter dem Lungen-, Prostata- und Kolonkarzinom ein. Es ist beim Mann die vierthäufigste, bei der Frau die neunthäufigste Krebsart. In Deutschland wurden im Jahr 2002 rund 25950 Neuerkrankungen (18850 Männer und 7.100 Frauen) registriert. 3.432 Männer und 2.019 Frauen sind daran verstorben (Bertz J et al., 2006). In den USA stehen den geschätzten 67160 Neuerkrankungen (50040 Männer und 17120 Frauen) 13750 Todesfälle (9630 Männer und 4120 Frauen) im Jahre 2007 gegenüber (Jemal A et al., 2007). Männer erkranken ungefähr zweimal häufiger als Frauen.

Die Inzidenz ist vom Alter, Geschlecht und ethnisch-geographischen Variablen (Schmoll HJ et al., 1997) abhängig und ist in industrialisierten Ländern höher als in ländlichen Regionen (Hautmann H, 2001).

Das Harnblasenkarzinom ist eine Erkrankung des älteren Menschen. Etwa 80 Prozent der Fälle werden bei Personen älter als 60 Jahre diagnostiziert. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69,1 Jahren bei Männer und 73,4 Jahren bei Frauen.

Innerhalb West-Europa und Nord-Amerika hat der Blasenkrebs die höchste und in Ost-Europa und Asien die niedrigste Inzidenz. In manchen Regionen mit hohen Inzidenzen ist das Blasenkarzinom mit spezifischen Erkrankungen oder Toxinexpositionen vergesellschaftet. Es bestehen epidemiologische Zusammenhänge z.B. mit der

Balkannephritis oder mit kontaminiertem Trinkwasser (Arsen in Taiwan) (Kälble T, 2001). Chronische Schistosomiasis (Bilharziose) führt zur Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms der Harnblase.

### 1.2.2 Ätiologie und Risikofaktoren.

Für die Entstehung von Urothelkarzinomen wird ein multifaktorieller, mehrstufiger Prozess angenommen, bei dem komplette bzw. inkomplette Karzinogene die maligne Transformation der Urothelzelle verursachen (Initiation) und proliferationsstimulierende Kokarzinogene in einem zweiten Schritt bzw. mehreren Schritten das Tumorstadium realisieren (Bichler KH et al., 2000).

Mit genetischen Untersuchungen wurden verschiedene chromosomale Veränderungen beim Harnblasenkarzinom nachgewiesen. Danach stellt der Verlust von Chromosom 9 ein frühes genetisches Ereignis in der Tumorgenese dar, weshalb auf diesem Chromosom die Lokalisation eines nicht näher charakterisierten Tumorsuppressorgens vermutet wird (Bichler KH et al., 2000).

Alterationen des p53-Tumorsuppressorgens auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p) und des Retinoblastom (Rb)-Gens auf Chromosom 13 sind mit einem Tumorstadium assoziiert (Hartmann A et al., 1999; Hartmann A et al., 2002; Ozen H, 1998).

Bedeutend für die Urothelkarzinogenese sind berufliche und außerberufliche Umwelteinflüsse sowie bestimmte Lebensgewohnheiten.

Für einige Substanzen ist die karzinogene Wirkung auf die Blase eindeutig belegt. So wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts die Häufung von Blasentumoren bei Chemikern, die Anilinfarbstoffen ausgesetzt waren, beschrieben (Rehn L, 1895). Im Jahr 1938 wurde in den Tierexperimenten nachgewiesen, dass eine Exposition gegenüber 2-Naphthylamine zu der Entstehung des Blasenkarzinoms führt (Hueper W et al., 1938).

Man unterscheidet zwischen exogenen Karzinogenen (aromatische Amine, phenacetinhaltige Medikamente, Nikotin, Koffein, Opium, Zytostatika), endogenen

Karzinogenen (Tryptophanmetabolite, Nitrosamine) sowie einer Tumorentstehung durch chronische Entzündungen (Blasenkonkremente, Parasiten) (Rübben H, 2007).

Als Hauptursache für die Entstehung eines Harnblasenkrebses gilt heute das Rauchen (Zigarettenrauch enthält über 40 karzinogene Substanzen). Der Zusammenhang zwischen dem Tabakrauchen und dem Harnblasenkarzinom war bereits vor Jahrzehnten bekannt (Lillienfeld A und Levin M, 1956). Viele Studien haben übereinstimmend ein zweifach bis dreifach erhöhtes relatives Risiko für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms bei Zigarettenrauchern demonstriert (Burch JD et al., 1989; Clavel J et al., 1989; Morrison AS, 1984; Zeegers MP et al., 2002). Man schätzt, dass bis zu 60% aller Blasenkarzinome Folge von Nikotinabusus sind (Morrison AS et al., 1984; Pitard A et al., 2001)

Als erwiesen gilt schließlich die Assoziation zwischen der Schistosomiasis (Bilharziose) der Harnblase und der Genese von Harnblasentumoren (Kälble T, 2001; Ross AG et al., 2002). Eine Infektion mit *Schistosoma haematobium* führt zur Entstehung des Plattenepithelkarzinoms der Harnblase (Yosry A, 2006). Außerdem scheinen Rasse, sowie geographische Einflüsse bezüglich der Häufigkeit von Harnblasenkarzinomen eine Rolle zu spielen (Rübben H und Otto T, 1993). Männliches Geschlecht sowie hohes Alter sind weitere Risikofaktoren für das Harnblasenkarzinom. Anstelle einer einzigen kausalen Noxe muss von einem multifaktoriellen Geschehen im Sinne einer Plurikarzinogenese ausgegangen werden (Pitard A et al., 2001).

### 1.2.3 Pathologie, Tumorentstehung, Stadieneinteilung

Das Urothel, auch Übergangsepithel genannt, ist eine spezielle Epithelschicht, welche die ableitenden Harnwege auskleidet und wie jedes Epithel auf einer Basalmembran aufliegt. Das normale Epithel besteht in der Regel aus drei Kernlagen. Der Basalmembran sitzen kleine kubische Basalzellen auf. Die proliferierten und differenzierten Zellen wandern zum Lumen der Harnblase hin, wobei sie sich vergrößern und schirmartig dem Urothel aufliegen (Bichler KH et al., 2000).

Durch Proliferation kann es zum unterschiedlichen Wachstumsmustern im Sinne von Hyperplasien kommen. Die einfache Hyperplasie kann fokal oder diffus zu einer Verbreiterung des Transitionalzellepithels führen und teilweise Atypien aufzeigen. Durch

papilläre Hyperplasien ist oft eine Abgrenzung zu den gutartigen Papillomen bzw. gut differenzierten Karzinomen schwierig. Bei zunehmenden Atypien kommt es zum Bild der Dysplasie des Urothels (die Dysplasien selber werden in 3 Stadien DI bis DIII eingeteilt). Mit zunehmender Manifestation der Dysplasien (DII und DIII) bleiben die Veränderungen in Bezug auf Kernvergrößerung, Anisomorphie und Hyperchromasie der Zellkerne bestehen (Bichler KH et al., 2000). Zur formalen Pathogenese des Transitionalzellkarzinoms wird ein multifokales Geschehen diskutiert (Jocham D, 1994; Kälble T, 2001).

Harnblasenkarzinome sind zu mehr als 99% primäre Neoplasien. Über 90% der Karzinome der Harnblase nehmen ihren Ursprung im Urothel. 3 bis 5 % sind Plattenepithelkarzinome und nur 2 bis 3 % zählen zu der Gruppe der Adeno- bzw. undifferenzierten Karzinome. Beim Urothelkarzinom kann herdförmig eine plattenepitheliale oder drüsige Metaplasie, oder beide Metaplasieformen nebeneinander auftreten (Block T et al., 1997).

Ebenfalls selten vorkommend sind Harnblasenneubildungen mesenchymalen Ursprungs (<1%). Diese können sowohl benigner (Fibrom, Myxom, Leiomyom, Hämangiom, Neurofibrom, Neurinom, Phäochromozytom), als auch maligner (Leiomyosarkom, Fibrosarkom, Rhabdomyosarkom, retikuloendotheliale Tumoren) Natur sein (Block T et al., 1997).

Für das Urothelkarzinom ist die papilläre histopathologische Grundstruktur, gestielt oder breitbasig, typisch (Block T et al., 1997).

Zur Charakterisierung des Tumorstadiums des Primärtumors werden in der prätherapeutischen klinischen Klassifikation (TNM) und in der postoperativen histopathologischen Klassifikation (pTNM) Ausdehnung des Primärtumors (T), Status der drainierenden Lymphknoten (N) und Vorhandensein oder Fehlen von Fernmetastasen (M) beschrieben (Pauwels RP et al., 1988).

Die aktuelle Stadieneinteilung und das Grading erfolgen nach der TNM-Klassifikation von 2002 der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (Tabelle 1) sowie der WHO / International Society of Urological Pathology Consensus Classification 1998 (Epstein JI et al., 1998). Trotz gut definierter Kriterien sind eine signifikante Variabilität bezüglich der Definition von Dysplasien und CIS sowie unterschiedliche Beurteilungen der Pathologen

bezüglich T1- versus Ta-Tumoren und des histologischen Differenzierungsgrades zu beobachten (Sobin DH und Wittekind C, 2002; Tosoni I et al., 2000).

Eine Sonderform des Blasenkarzinoms ist das Carcinoma in situ (CIS) (Leitlinien DGU, 1998) mit hochgradiger Polymorphie der Kerne und Desquamation einzelner Zellen (Bichler KH et al., 2000; Gilbert HA et al., 1978). Es infiltriert nicht in die Lamina propria mucosae. Typische Zellveränderungen sind große Kerne mit hohem Chromatingehalt, prominente Nucleoli und erhöhte mitotische Aktivität. Weiter findet sich eine unregelmäßige Zellordnung in der Schleimhaut. Makroskopisch weist das CIS nur uncharakteristische Veränderungen der Mucosa wie Rötung und lachsfarbene Verfärbung auf. Das CIS kann sowohl einzige Tumorentität als auch gleichzeitig in Kombination (assoziiertes CIS) mit einem anderen Blasentumor vorkommen (Böhle A, 1997; Jocham D, 1994).

**T - Primärtumor**


---

Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Ta	Nicht-invasives papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ, flaches Wachstum
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert Muskulatur
T2a	Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
T2b	Tumor infiltriert tiefere Muskulatur (äußere Hälfte)
T3	Tumor infiltriert perivesikales Gewebe
T3a	mikroskopisch
T3b	makroskopisch (extravesikale Masse)
T4	Tumor infiltriert Prostata, Uterus, Vagina, Beckenwand oder Bauchwand
T4a	Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand

**N – Regionäre Lymphknoten**


---

Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem Lymphknoten $\leq$ 2cm in größter Ausdehnung
N2	Metastase in solitärem Lymphknoten $>$ 2cm, aber $\leq$ 5cm in größter Ausdehnung oder multiple LK $<$ 5cm
N3	Metastasen in Lymphknoten $>$ 5cm in größter Ausdehnung

**M - Fernmetastasen**


---

Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für das Vorhandensein von Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

**Tabelle 1:** TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms gemäß Union Internationale Contre le Cancer (UICC) 2002 (Sobin DH und Wittekind C, 2002)

#### 1.2.4 Klinik und Symptomatik

Die Diagnosestellung des Blasenkrebses ist oft durch die Ähnlichkeit der Symptome mit gutartigen Erkrankungen (Harnwegsinfektionen, interstitielle Zystitis, Prostatitis, Steinabgang bei der Urolithiasis) erschwert.

Das häufigste Symptom (Leitsymptom) ist die schmerzlose, intermittierende Makrohämaturie (in ca. 80% der Fälle) (Boman H et al., 2002). Die Prävalenz der asymptomatischen Hämaturie in der Bevölkerung wird bis zu 2,5% abgeschätzt (Jemal A et al., 2006). In einer Untersuchung mit 1000 Patienten, die eine schmerzlose Makrohämaturie hatten, wurde nur bei 15 % das Blasenkarzinom diagnostiziert (Lee LW und Davis E, 1953). Der Grad der Hämaturie korreliert nicht mit der Ausdehnung der Erkrankung. Allerdings gilt als allgemeiner Grundsatz, dass jede Hämaturie bis zum Beweis des Gegenteils als tumorverdächtig einzustufen ist.

In 30% sind Blasenkarzinome mit zystitischen Beschwerden, wie Pollakisurie und Urgesymptomatik (plötzlich auftretender, starker Harndrang), vergesellschaftet (maligne Zystitis). Nur selten zeigt der Patient zum Zeitpunkt der Diagnose Zeichen der fortgeschrittenen Erkrankung: Das sind Flankenschmerzen bei Ureterobstruktion, Ödeme der unteren Extremität oder Tumorschmerzen aufgrund lokaler Progredienz. Außerdem typisch für das fortgeschrittene Stadium sind die Gewichtsabnahme und die Anämie. Hinzu können Restharnbildung oder Harnverhalt, Lymphödeme der unteren Extremität (lymphogene Metastasierung im kleinen Becken) sowie Knochenschmerzen, Husten mit Auswurf, Veränderung der Leberenzyme (hämatogene Metastasierung) kommen.

#### 1.2.5 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms

Die Ureterozystoskopie mit Harnblasenspülzytologie wird als „Goldstandard“ in der Abklärung des Blasentumors bezeichnet. Zur Verbesserung der endoskopischen Diagnostik der Harnblase wird in den letzten Jahren die 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)-induzierte Fluoreszenzzystoskopie zunehmend eingesetzt. Es liegen bereits Ergebnisse von einigen Arbeitsgruppen vor, die der Fluoreszenzzystoskopie eine Sensivitätssteigerung von ca. 25% für die Tumordetektion und von ca. 90% für die

Detektion von Dysplasien / CIS der Harnblase bescheinigen (Jichlinski P et al., 1997; Jichlinski P und Leisinger HJ, 2005; Kriegmair M et al., 1995).

Die alleinige Untersuchung einer Urinzytologie ist wegen zu geringer Sensitivität ungenügend. Sie kann im Zusammenhang mit G3-Tumoren oder CIS nützlich sein, schließt jedoch das Vorliegen einer gut differenzierten Neoplasie nicht aus (Badalament RA et al., 1988).

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Diagnostik des Blasenkrebses ist die Bildgebung. Der Ultraschall gehört zur Initialabklärung der Hämaturie. Dabei darf jedoch die Wertigkeit bezüglich Beurteilung der Blase nicht zu hoch angesetzt werden, da zum Beispiel Blasenwandverdickung oder eine Trabekulierung im Rahmen einer Prostatahyperplasie einen Tumor vortäuschen können und umgekehrt kleine oberflächliche Tumoren oder ein CIS der Sonographie entgehen. Die Intravenöse Urographie (IVU) bzw. intravenöse Pyelographie (IVP) dient vor allem der Erkennung von Veränderungen des oberen Harntraktes bei urothelialen Zweittumoren (Häufigkeit bis 2,6% (Millan-Rodriguez F et al., 2000)) oder einer Abflussbehinderung bei Tumoren im Bereich der Uretereinmündung in die Blase.

In der letzten Zeit wird IVU fortschreitend durch die Spiral-CT-Untersuchung ersetzt. Die Computertomographie lässt die lokale Ausdehnung, die Beteiligung der Lymphknoten retroperitoneal oder im Becken, viszerale, pulmonale oder ossäre Metastasierung erkennen. Jedoch ist die Sensitivität für die Beurteilung der Lymphknotenbeteiligung relativ niedrig (falsch negative Rate 68%, falsch positive Rate 16%) (Herr HW, 1996).

Die Skelettszintigraphie kann zur Detektion von Knochenmetastasen Staginguntersuchung bei infiltrativen Blasenkarzinomen vor totaler Zystektomie verwendet werden. Bei fehlender Erhöhung der alkalischen Phosphatase und ohne Knochenschmerzen ist sie jedoch fraglich indiziert (Davey P et al., 1985).

#### 1.2.6 Differenzialdiagnose

Bei Vorliegen einer Hämaturie (Leitsymptom) sind differenzialdiagnostisch entzündliche Prozesse der Harnblase (Zystitis, Strahlenblase, Bilharziose), der Prostata (Gefäßkongestionen bei BPH) und der Niere (Glomerulonephritis) zu berücksichtigen. Ferner ist eine Steinerkrankung oder eine Anomalie des Harntrakts auszuschließen.

Daneben müssen auch alle anderen Tumoren des harnableitenden Systems (Niere, Nierenbecken, Ureteren, Prostata, Urethra) sowie Infiltrationen eines Rektumkarzinoms oder eines gynäkologischen Tumors ausgeschlossen werden (Murakami S et al., 1990).

### 1.2.7 Therapie

Die Therapiemaßnahmen des Harnblasenkarzinoms orientieren sich in erster Linie am Tumorstadium. Unter Berücksichtigung von Prognose, Lebensalter, Allgemeinzustand und individueller Lebensqualität des Patienten werden neben den operativen Maßnahmen auch Chemo-/Immuntherapie (topisch, systemisch), Strahlentherapie und kombinierte Radiochemotherapien mit und ohne Hyperthermie eingesetzt. Diese Maßnahmen können sowohl unter kurativem als auch palliativem Therapieansatz angewandt werden.

#### 1.2.7.1 Therapie von nicht-invasiven (pTa-1, G1-2) und High-Risk-Karzinomen (pTa-1 G3, Cis).

Der Standard bei der initialen Therapie ist eine komplette endoskopische transurethrale Resektion der sichtbaren Blasentumoren (TUR-B) (Block T et al., 1997; Miller K und Weißbach L, 1998). Die Qualität der Erstbehandlung hat dabei entscheidenden Einfluss auf die weitere Prognose der Tumorerkrankung. Wie es schon vorher erwähnt, erleichtert die 5-ALA-induzierte Fluoreszenzzystoskopie die Detektion der multifokalen Tumoren und verringert das Rezidiv nach dem TUR-B (Daniltchenko DI et al., 2005; Denzinger S et al., 2007; Jichlinski P et al., 2003; Schmidbauer J et al., 2004).

Die einmalige adjuvante Instillation von Zytostatika in die Blase unmittelbar nach der TUR verhindert die Implantation der flottierenden Tumorzellen sowie ermöglicht eine so genannte „Chemoresektion“ von Tumoren, die kleiner als 5mm sind. Dies hat zwar Einfluss auf ein Rezidiv, jedoch spielt bei der Progression der Erkrankung keine Rolle.

Wenn histopathologisch Tumoren pTa G1 bei erster Resektion nachgewiesen werden, erfolgt eine zystoskopische Nachkontrolle in 3 Monaten. Bei High-grade-Ta- oder –T1-Tumoren sollte eine Nachresektion gemäss der Leitlinien der europäischen Gesellschaft für Urologie in 2-6 Wochen durchgeführt werden. Anschliessend, Tumorfreiheit

vorrausgesetzt, wird eine intravesikale Immuntherapie mit BCG (Bacillus Calmette-Guerin) empfohlen (Babjuk M et al., 2008).

Für das Carcinoma in situ (CIS) hat sich die Kombination TUR-B (+ Quadrantenbiopsie) und topische Immun-Instillationstherapie mit BCG (Bacillus Calmette-Guerin) zur Rezidivprophylaxe etabliert (Soloway MS et al., 2007). Hierbei werden Vollremissionen im Mittel von bis zu 80% über 4-5 Jahre erreicht (Smith JA, Jr. et al., 1999). Andere topische Chemotherapien mit Mitomycin C, Doxorubicin, Adriamycin und Epirubicin sind dem BCG bei dieser Indikationsgruppe leicht unterlegen.

Bei rezidivierenden multiplen High-grade Tumoren (pT1 G2-G3, CIS) oder bei sogenannter „BCG failure“ soll eine radikale Zystektomie diskutiert bzw. durchgeführt werden, da sonst sich das erkrankungsspezifische Überleben dramatisch verringert (Raj GV et al., 2007).

#### 1.2.7.2 Therapie des muskelinvasiven Karzinoms (pT2-4, Nx, M0)

Eine Therapie der Wahl bei dem organbegrenztem muskelinvasiven Karzinom der Harnblase ist die radikale Zystektomie (Jakse G et al., 2004). Diese Art der operativen Behandlung beinhaltet beim Mann die Resektion von Blase, Prostata und Samenblasen. Bei Tumorbefall muss die Urethra einseitig oder zweiseitig reseziert werden. Bei der Frau werden zusätzlich zur Harnblase der Uterus, beide Adnexen, die Vaginalvorderwand und die Urethra reseziert (sogenannte vordere Exenteratio) (Wetterauer U et al., 1995).

Geschlechtsunabhängig werden die Patienten gleichzeitig pelvin lymphadenektomiert. Hierbei werden die Lymphknoten der Fossa obturatoria, der Parailiakal-Region und gegebenenfalls der Aortenbifurkation reseziert (Wetterauer U et al., 1995). Retrospektive Studien zeigen eine positive Korrelation zwischen der Radikalität der pelvinen Lymphadenektomie und Prognose nach radikaler Zystektomie. Dabei scheint Anzahl der entfernten Lymphknoten sowie kraniale Begrenzung der Lymphadenektomie eine entscheidende Rolle für Tumorfrees Überleben zu spielen (Leissner J et al., 2004; Leissner J, 2005). Als Harnableitungen kommen mehrere Möglichkeiten in Frage (Miller K und Weißbach L, 1998; Wetterauer U et al., 1995): inkontinente Harnableitungen (Ureterokutanostomie, Conduit) und kontinente Harnableitungen (orthotope Ersatzblase, Pouch). Die Vielzahl der operativen Verfahren ermöglicht es, die Therapie den

individuellen Bedürfnissen der Patienten optimal anzupassen.

Als eine weitere Therapieoption für das muskelinvasive Blasenkarzinom kann die Radiotherapie genannt werden. Man unterscheidet prinzipiell die Strahlentherapie mit kurativer von der mit palliativer Zielsetzung. Beim kurativen Ansatz ist eine alleinige Radiotherapie einer Radiochemotherapie bezüglich der lokalen Kontrolle deutlich unterlegen (Weiss C et al., 2008).

### 1.2.7.3 Stellenwert der systemischen Chemotherapie bei metastasiertem Urothelkarzinom

Um das Überleben für die Patienten mit muskelinvasivem Urothelkarzinom der Harnblase zu verlängern, kann die Chemotherapie vor (Neoadjuvant) und nach (Adjuvant) der Zystektomie herangezogen werden. Das Transitionalzellkarzinom gilt als mässig chemotherapiesensitiv (Loehrer PJ, Sr. et al., 1992; Sternberg CN et al., 1989).

#### 1.2.7.3.1 Neoadjuvante systemische Chemotherapie

Das neoadjuvante Chemotherapiekonzept vor einer lokalen operativen Tumorsanierung hat einerseits die präoperative Reduktion des Tumorbefundes zum Ziel und dient andererseits der lokalen Kontrolle bei bereits bestehender okkulten Lymphknotenmetastasierung vor allem dann, wenn lediglich von Mikrometastasen ausgegangen werden muss. Im Rahmen einer Metaanalyse unter der Leitung des „Medical Research Council“ wurden die bislang liegenden 11 randomisierte Studien mit Patientengesamtzahl über 3000 verglichen und zusammenfassend analysiert (2005). So zeigt sich z.B., dass nach 5 Jahren durch die neoadjuvante Chemotherapie das Überleben von 55% auf 60% bei Patienten des klinischen Stadiums T1-2, bei Patienten mit Stadium T3 von 40% auf 45% und bei Patienten mit klinischem Stadium T4 von 25% auf 30% verbessert werden konnte. Aufgrund der grenzwertigen Unterschiede kommen die Autoren aber zu dem Schluss, dass derzeit eine routinemäßige Anwendung nicht empfohlen werden kann (Tabelle 2).

Referenz	Neoadjuvanter Arm	Standardarm	Patientenanzahl	Ergebnis
Wallace et al., 1991	C+RTx	RTx	255	n.s.
Martinez-Pineiro et al., 1995	C+RZ	RZ	121	n.s.
Coppin et al., 1996	C+RTx oder RTx+RZ	RTx oder RTx+RZ	99	n.s.
Orsatti et al., 1995	C+5FU+RTx+RZ	RZ	104	n.s.
EORTC/MRC, 1999	CMV+RTx oder RZ	RTx oder RZ	976	5,5%Benefit
Grossman et al., 2003	MVAC+RZ	RZ	317	Borderline
Malmström et al., 1996	A+C+RTx oder RZ	RTxoderRZ	311	n.s.
Sherif et al., 2007	M+C+RZ	RZ	317	n.s.
Bassi et al., 1999	MVAC+RZ	RZ	206	n.s.
Abol-Enein et al., 1997	CarboMV+RZ	RZ	194	Benefit
GISTV, 1996	MVEC+RZ	RZ	171	n.s.
C: Cisplatin; 5FU: 5-Fluorouracil; M: Methotrexat; A: Doxorubicin; V: Vinblastin; Carbo: Carboplatin; E: Etoposid; RZ: radikale Zystektomie; RTx: Strahlentherapie ;n.s.: nichtsignifikant.				

**Tabelle 2:** Randomisierte Phase-III-Studien zur neoadjuvanten Chemotherapie beim Blasenkarzinom (Suttman H et al., 2007)

### 1.2.7.3.2 Adjuvante Chemotherapie

Die adjuvante Chemotherapie hat zum Ziel, den Erfolg vorangegangener, in kurativer Absicht durchgeführter, lokaler Maßnahmen zu konsolidieren. Man unterscheidet eine Mono- und Polychemotherapie.

Historisch haben sich in der Monotherapie v.a. Cisplatin und Methotrexat mit Remissionsraten um 30% als wirksam erwiesen und sind solchen Substanzen wie Doxorubicin, 5-Fluoracil, Vinblastin oder Mitomycin deutlich überlegen (Bamias A et al., 2006b; Sanchez-Carbayo M und Cordon-Cardo C, 2007). Zahlreiche der neueren Zytostatika wie z. B. Docetaxel, Paclitaxel, Gemcitabin oder neuerdings Pemetrexed, Vinflunin und die Epothilone zeigen bereits in der Monotherapie z.T. vergleichbare Remissionsraten wie Cisplatin, wobei Paclitaxel mit einem Ansprechen von 42% die höchsten Remissionsraten erzielt (Bamias A et al., 2006b).

Mitte der achtziger Jahre wurde ein Polychemotherapieprotokoll MVAC (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin) entwickelt, welches im Vergleich mit Monotherapien als überlegen gilt (Sternberg CN et al., 1985). Auch wenn die hervorragenden Ergebnisse von MVAC in späteren Studien nicht wieder erreicht werden konnten, wurde

deutlich, dass mit einer Polychemotherapie eine Remissionsrate von >50%, ein Überleben nach 3 Jahren von 20-25% und ein medianes Überleben von >12 Monate erzielt werden kann (Bamias A et al., 2006b). In zahlreichen randomisierten Phase-II/III-Studien mit anderen Kombinationschemotherapieprotokollen wurde eine Prävalenz des MVAC-Schemas gezeigt (Tabelle 3). Eine Dosisintensivierung des Protokolls zeigte in einer Langzeitauswertung nach 7,3 Jahren medianer Beobachtung gegenüber dem Standard-MVAC ein Vorteil für das Gesamtüberleben nach 5 Jahren 22% vs. 14% (Sternberg CN et al., 2006). Aufgrund der hohen Toxizität des Schemas sind jedoch eingeschränkte Nierenfunktion und schlechter Allgemeinzustand (Karnofsky Index <80%) limitierende Faktoren.

Von der Maase verglich das MVAC Schema mit der Kombination Gemcitabin/Cisplatin (GC) (von der Maase H et al., 2000). Bei gleicher Effektivität zeigten sich bei GC wenige Nebenwirkungen. Die Toxizität unterschied sich in erster Linie hinsichtlich der Myelotoxizität und der Mukositisrate. Diese Studie führte dazu, dass sich die Kombination Gemcitabin/Cisplatin als zweite „Erstlinientherapie“ neben dem MVAC-Schema etablierte.

Schema	Patienten[n]	Remissionsrate[%]	Medianes progressionsfreies Überleben [Monate]	Medianes Gesamtüberleben [Monate]	Quelle
MVAC Cisplatin	126 120	39 12	10,0 4,3	12,5 8,2	Loehrer et al., 1992
MVAC CisCA	65 55	65 55	11,2 8,3	12,6 10	Logothetis et al., 1990
MVAC HD- MVAC	129 134	58 72	8,2 9,1	14,1 15,5	Sternberg et al., 2001/2006
GC MVAC	203 202	49 46	7,4 7,4	13,8 14,8	Von der Maase et al., 2000/2005
MVAC PC	44 41	36 28	8,7 5,2	15,4 13,8	Dreicer et al., 2004
DC MVAC	111 109	37 54	6,1 9,4	14,2 9,3	Bamias et al., 2004
GC PCG	315 312	46 57	8,4 7,7	12,8 15,7	Bellmunt et al., 2007
<i>MVAC</i> : Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin; <i>CisCA</i> : Cisplatin, Cyclophosphamid, Adriamycin; <i>HD-MVAC</i> : high-dose MVAC; <i>GC</i> : Gemcitabin, Cisplatin; <i>PC</i> : Paclitaxel, Cisplatin; <i>DC</i> : Docetaxel, Cisplatin; <i>PCG</i> : Paclitaxel, Cisplatin, Gemcitabin.					

**Tabelle 3:** Zusammenfassung randomisierter Phase-II/III-Studien in der Therapie des metastasierten Urothelzellkarzinoms (Wolter P et al., 2007)

„Zweitlinientherapie“ oder sogenannte *second-line therapy* stellt eine weitere Therapieoption bei einem Progress der Grunderkrankung nach *first-line therapy* dar (MVAC, GC). In den letzten 20 Jahren wurden solche Substanzen wie Ifofosfamid, Taxane, Gemcitabine, Oxaliplatin, Vinflunin und Pemetrexed als mögliche Alternative für „Zweitlinientherapie“ evaluiert. Jedoch stehen basierend auf aktuellen Phase-II-Studien heutzutage immer noch nur limitierte Optionen zur Verfügung (Culine S et al., 2006). Die Ansprechraten von einzelnen Substanzen befinden sich zwischen 0 und 29% (De Santis M und Bachner M, 2007). *Han et al.* behandelten 30 Patienten mit dem MVAC-Schema nach Progression der Erkrankung unter GC. In dieser Untersuchung konnte eine Ansprechrate von 30% gezeigt werden, jedoch hat sie als einzige Studie mit geringem Patientenzahl keine Aussagekraft (Han KS et al., 2008).

### 1.2.8 Prognose

Das muskelinvasive Blasenkarzinom ist ein höchst aggressiver epithelialer Tumor mit

frühzeitiger Metastasierung. Die 5-Jahres Überlebensraten (5-JÜR) sind von pathologischen Stadium und Lymphknotenmetastasen abhängig. So erreichen in einigen Studien 5-JÜR Lymphknoten-(LN-) negative Patienten etwa 80% im Stadium pT2, 65% im Stadium pT3 und 45% im Stadium pT4 (Hautmann RE et al., 2006; Stein JP et al., 2001). Bei LN-Positivität sieht die Lage viel dramatischer aus, da 5-JÜR nur 16,5% bis 20% betragen (von der Maase H et al., 2005).

### 1.2.9 Alternativen zur Chemotherapie beim metastasiertem Urothelkarzinom

Ein bereits metastasiertes Urothelkarzinom hat heutzutage trotz zur Verfügung stehender Chemotherapeutika eine schlechte Prognose. Deshalb wird aktiv nach neuen Substanzen bzw. Therapieoptionen gesucht.

Die Analyse molekularer Regulationsmechanismen und deren Einfluss auf das biologische Verhalten des Urothelkarzinoms eröffnen die Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Therapieansätze (Mitra AP et al., 2006). So wurde bereits gezeigt, dass Rezeptoren der epidermal growth factor (EGF) Familie beim Urothelkarzinom häufig überexprimiert sind und neben der Korrelation mit einer schlechten Prognose auch die Möglichkeit zeigen, sich durch den Einsatz neuer Substanzen zu inhibieren und somit als therapeutisches „Target“ nutzen zu lassen (Kruger S et al., 2002; Ravery V et al., 1995). Solche Substanzen (z.B. Cetuximab), die sich bereits in der Standardtherapie des kolorektalen Karzinoms, des Mammakarzinoms, der Kopf-Hals-Tumoren oder des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms etabliert haben, sind im Rahmen der Therapie des Urothelkarzinoms noch Gegenstand prä- und klinischer Prüfungen (Inoue K et al., 2000). Präklinisch führte der Einsatz bei Urothelkarzinomzellen von „Multiple-Targed“-Tyrosinkinaseinhibitoren (Sunitinib), die unter anderem „platelet-derived growth factor Receptor“ (PDGF), RET, c-KIT, Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Flt-3 (FMS like tyrosine kinase 3) hemmen und für die Behandlung von fortgeschrittenen gastrointestinalen stromalen Tumoren (GIST) sowie Nierenzellkarzinomen zugelassen sind, kombiniert mit Cisplatin bereits zu einer Inhibition der Proliferation (Sonpavde G et al., 2009). Eine Zwischenanalyse aus der ersten Phase-II-Studie mit Sunitinib zeigte bei 7% der Patienten eine partielle Remission, 53% Tumorstabilisierung und 40% eine geringgradige Rückbildung der Tumorgroße.

Ein anderer Angriffspunkt ist die Angiogenese. Der VEGF, der einen wichtigen Regulationsmechanismus des Gefäßwachstums darstellt, wird beim Urothelkarzinom überexprimiert und ist mit einem klinisch ungünstigen Verlauf vergesellschaftet (Crew JP et al., 1997). Die Blockierung der VEGF als neuer Therapieansatz wird bereits bei anderen Tumorarten breit angewendet. Bevacizumab, ein Monoklonaler Antikörper gegen VEGF, ist zur Therapie von Kolorektalen Karzinomen und Mammakarzinomen zugelassen und wird momentan in Kombination mit der Chemotherapie getestet. Der positive Effekt wurde bereits in den experimentellen Arbeiten *in vivo* gezeigt (Inoue K et al., 2000).

Bekannter weise wird die Tumorangiogenese unter hypoxischen Bedingungen beeinflusst. Dies wird dadurch erklärt, dass die Expression des HIF-1 $\alpha$  erhöht wird. Der letzte induziert eine ganze Reihe von Gefäßwachstumsfaktoren (Berta M et al., 2004; Brahimi-Horn MC und Pouyssegur J, 2005). Experimentelle Studien zeigen, dass durch die Hemmung des HIF 1 $\alpha$  eine gute Tumorregression erreicht werden kann (Jain RK, 2005; Yeo EJ et al., 2003).

Jedoch viel herausfordernder erscheint eine mögliche Kontrolle der Tumorangiogenese und somit Tumorprogression bzw. Metastasierung eines Malignoms durch Korrektur der Gewebshypoxie. *In vitro* konnte bereits eine Verminderung der HIF-1 $\alpha$  sowie VEGF Expression in einer Transitionalzellkarzinom-Kultur bei Erhöhung des O<sub>2</sub>-Partialdruckes gezeigt werden (Fechner G et al., 2005).

Da die Oxygenierung eine Schlüsselrolle in der Progression der Neoplasien spielt, soll dies in dem nächsten Kapitel näher erleuchtet werden.

### 1.3 Die Gewebsoxygenierung.

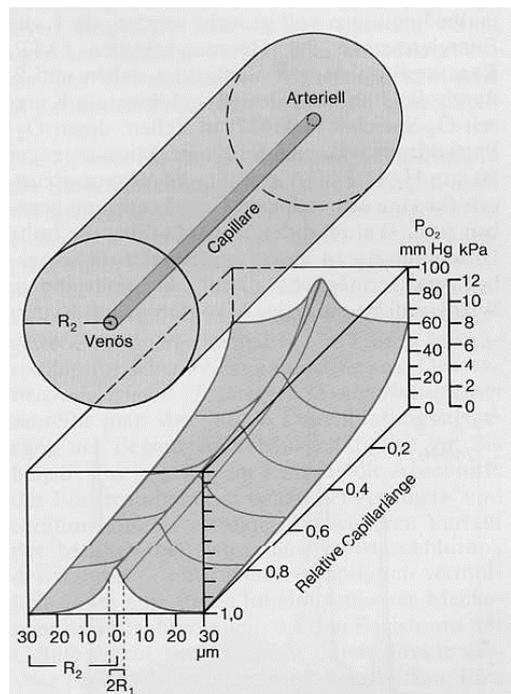
#### 1.3.1 Oxygenierung im gesunden Gewebe

Unter Gewebsatmung versteht man den Atemgaswechsel innerhalb eines Zellverbandes bei der biologischen Oxidation der Nährstoffe. Der Sauerstoff wird von den Zellen aus dem Kapillarblut aufgenommen und im oxidativen Stoffwechsel verbraucht, während gleichzeitig das als Stoffwechselendprodukt freigesetzte Kohlendioxid an das Kapillarblut abgegeben wird. Neben der Höhe des Partialdruckes für Sauerstoff im Kapillarblut sind

die Kapillarisation und die Mikrozirkulation als Einflussgrößen auf den Gasaustausch bekannt. Sowohl die Austauschfläche der Atemwege für die Diffusion zwischen Blut und Gewebe als auch die Diffusionsstrecken innerhalb des Gewebes sind abhängig von der Anzahl der unmittelbar durchströmten Kapillaren, ihrer Länge und ihrem Abstand.

Unter den verschiedenen Modellen, mit deren Hilfe versucht wurde, die Bedingungen für den Atemgasaustausch in den Geweben zu beschreiben, ist das bekannteste und am häufigsten angewandte der Gewebszylinder nach Krogh. Abbildung 1 zeigt die  $O_2$ -Partialdruckverteilung im Versorgungszylinder einer Kapillare nach Krogh. Anhand dieser Abbildung lässt sich der Abfall des  $pO_2$  Wertes entlang einer Kapillare darstellen. Dies zeigt den Einfluss der Diffusionsstrecke auf die Sauerstoffversorgung des Gewebes.

Unter den möglichen weiteren Ursachen einer  $O_2$ -Mangelversorgung stehen drei im Vordergrund. Die Erniedrigung des  $O_2$ -Partialdruckes im arteriellen Blut (arterielle Hypoxie), die Herabsetzung der  $O_2$ -Bindungskapazität des Blutes (Anämie) und die Einschränkung der Organdurchblutung (Ischämie).



**Abbildung 1:**  $PO_2$ -Verteilung im Versorgungsbereich einer Kapillare nach Krogh (Grote J und Pohl U, 2005).

### 1.3.2 Gewebsoxygenierung und Tumorangiogenese

Der Begriff „Angiogenese“ (der Prozess der Neubildung von Gefäßen) wurde erstmals 1935 von *A.T. Hertig* im Zusammenhang mit der plazentaren Gefäßneubildung geprägt. Zu derartigen Gefäßneubildung kommt es im erwachsenen Organismus entweder im Rahmen physiologischer Prozesse wie der Wundheilung oder pathologischer Prozesse wie der diabetischen Retinopathie, der Rheumatoiden Arthritis, dem Myokardinfarkt sowie dem Wachstum solider Tumoren (Carmeliet P, 2003; Risau W, 1997).

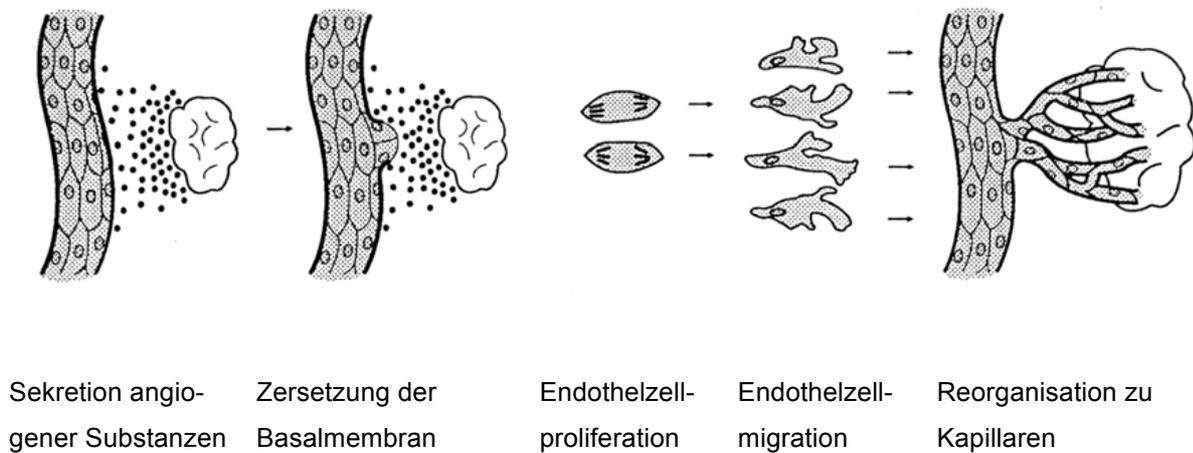
Anhand experimenteller Beweise formulierte J. Folkman im Jahr 1971 eine Hypothese, dass solide Tumoren bzw. Tumorstadium angiogenese-abhängig und eine Verhinderung der Angiogenese eine möglichen therapeutischen Blockierung der Tumorstadium sein könnten (Folkman J, 1971).

Die Tumorstadium verläuft in einer avaskulären und einer vaskulären Phase (Folkman J, 1985). In der avaskulären Phase findet keine bzw. eine unzureichende Neoangiogenese statt, da es bis zu einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> eine Ernährung des Tumors per diffusionem aus benachbartem Gewebe möglich ist. In dieser Phase geht der Wachstumsprozess sehr langsam vor sich, Tumorexpansion und Metastasierung sind begrenzt.

In der vaskulären Phase wird die Angiogenese auf zwei Wegen induziert: zum einen durch die Tumorzellen selbst, welche proangiogenetische Moleküle produzieren, zum anderen durch die angiogene Aktivität rekrutierter Makrophagen oder durch aus der extrazellulären Matrix mobilisierter Substanzen (z.B. basic fibroblast growth factor - bFGF). Es kommt zu exponentiellem Wachstum mit hoher Geschwindigkeit und Tendenz zur Filiarisierung (Folkman J und Klagsbrun M, 1987).

Die eigentliche Angiogenese findet in vier Schritten statt:

1. Proteolytische Zersetzung der Basalmembran und der umgebenden extrazellulären Matrix
2. Endothelproliferation
3. Endothelmigration zur Quelle des angiogenen Stimulus hin
4. Reorganisation zu einem kapillären Netzwerk (Campbell SC, 1997) (Abbildung 2)



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Angiogenese (Campbell SC, 1997)

Philp et al. konnten zeigen, dass die Bestimmung der Gefäßdichte am primären histologischen Präparat eines invasiven Harnblasenkarzinoms als ein prognostischer Indikator dienen kann. Außerdem es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der T-Stadium (Tumorausdehnung) und Gefäßanzahl nachgewiesen werden. Zwischen dem Differenzierungsgrad der Harnblasentumoren und Gefäßdichte im histologischen Präparat bestand aber keine Beziehung (Philp EA et al., 1996).

In der anderen Studie wurde eine Korrelation zwischen erhöhter Gefäßdichte und Rezidivneigung sowie verminderter Gesamtüberlebenszeit nachgewiesen (Bochner BH et al., 1995). Die Steigerung des Mortalitätsrisikos für Patienten mit erhöhter Gefäßanzahl des Tumors wird mit dem Faktor 2,5 beschrieben (Dickinson AJ et al., 1994).

Für mehrere andere Neoplasien wie z.B. das Mammakarzinom, das Prostatakarzinom, das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom oder das maligne Melanom konnte in verschiedenen Studien einen Zusammenhang zwischen Gefäßneubildung und Tumorprogression bzw. Metastasierung gezeigt werden (Stein JP et al., 1998).

### 1.3.3 Pro- und Antiangiogene Faktoren

Die Angiogenese wird intensiv durch die Aktion der pro- und antiangiogenetischen Faktoren reguliert. Die ersten Moleküle, die im Gefäßwachstum beteiligt sind, wurden im Jahr 1971 entdeckt (Folkman J et al., 1971). Die wichtigsten pro- und antiangiogenen Faktoren und deren Funktionen sind in der Tabelle 4 und 5 aufgezählt.

proangiogene Faktoren	Funktion
Vascular endothelial growth factor (VEGF) Familie	stimuliert die Angiogenese
Vascular endothelial growth factor Receptor (VEGFR); NRP-1	leitet angiogene- und Überlebenssignale ein
Ang1 und Tie2	stabilisiert Gefäße, inhibiert Permeabilität
PDGF-BB und Rezeptoren	rekrutiert Gefämuskelzellen
TGF- $\beta$ 1, Endoglin, TGF- $\beta$ -Rezeptoren	stimuliert die Produktion von extrazellulärer Matrix
FGF, HGF, MCP-1	stimulieren die Angio/Arteriogenese
Integrine	Rezeptoren für Matrixmakromoleküle u. Proteinase
VE-Cadherine, PECAM (CD31)	endotheliale junktionale Moleküle
Ephrine	regulieren die arterio-venöse Spezialisierung
Plasminogenaktivatoren, MMPs	Matrixremodelling, Freisetzung von Wachstumsfaktoren
PAI-1	stabilisiert wachsende Gefäße
NOS, COX2	stimuliert die Angiogenese u. Vasodilatation
AC133	reguliert die Angioblastendifferenzierung
Chemokine	pleiotrope Funktion in d. Angiogenese
Id1/Id3	bestimmt die endotheliale Plastizität

**Tabelle 4:** Proangiogene Faktoren und deren Funktion (Carmeliet P und Jain RK, 2000; Yancopoulos GD et al., 2000)

antiangiogene Faktoren	Funktion
VEGFR-1, lösli. VEGFR-1, lösli. NRP-1	senkt VEGF, VEGF-b und PlGF
Ang2	Antagonist von Ang1
TSP-1, -2	inhibiert endotheliale Migration, Wachstum, Adhäsion u. Überleben
Endostatin (Kollagen XVIII Fragment)	inhibiert endotheliale Migration u. Überleben
Vasostatin, Calreticulin	inhibiert endotheliales Wachstum
Platelet Factor 4	inhibiert die Bindung von VEGF und bFGF
TIMPs, MMP Inhibitoren , PEX	unterdrücken die pathologische Angiogenese
IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\mu$ , IP-10, IL-4, IL-12, IL-18	inhibiert die endotheliale Migration, reguliert bFGF herunter
Prolactin (M., 16K)	inhibiert BFGF/VEGF
VEGI	moduliert zelluläres Wachstum
Fragment v. SPARC	inhibiert die endotheliale Bindung und Aktivität von VEGF
Osteopontin-Fragment	interferiert mit Integrin-Signalen
Maspin	Proteasen-Inhibitor
Canstatin, proliferin related protein, restin	unbekannte Funktion

**Tabelle 5:** Die antiangiogene Faktoren und deren Funktion (Carmeliet P und Jain RK, 2000; Yancopoulos GD et al., 2000).

### 1.3.3 Induktion der Angiogenese durch die Gewebshypoxie

Der sogenannte „angiogene Switch“ entscheidet durch Angiogeneseinduktion oder – inhibition über Gefäßwachstum, Gefäßerhalt oder Regression (Carmeliet P, 2003; Hanahan D und Folkman J, 1996). Dieser Ablauf ist gravierend für die Tumorprogression, da nur so Blutgefäße in den Tumor einwachsen und ihm Sauerstoff- und andere Stoffwechselmetabolite innerhalb des Diffusionslimits von 100-200 µm bieten können (Carmeliet P und Jain RK, 2000; Hanahan D und Folkman J, 1996). Eine Arbeitsgruppe zeigte, dass trotz Neovaskularisation das Sauerstoffangebot unterhalb des zellulären Bedarfs bleibt (Harris AL, 2002). Der Sauerstoffmangel wirkt regulatorisch auf die Expression verschiedener angiogener Faktoren und ist somit an der Angiogenese beteiligt (Carmeliet P et al., 1998; Iyer NV et al., 1998; Ryan HE et al., 1998).

Die Hypoxie wird als ein äußerst kritischer Parameter für die Tumorprogression und – Aggressivität dargestellt (Kunz M und Ibrahim SM, 2003). Die Verminderung des Sauerstoffpartialdruckes fördert die Bildung von verschiedenen Transkriptions- und Wachstumsfaktoren. Ein Hauptvertreter ist der Hypoxie induzierbare Faktor (HIF). HIF ist ein Heterodimer, welches aus einer sauerstoffabhängigen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit besteht, beide Komponenten werden stetig in konstanter Rate synthetisiert (Berta M et al., 2004; Brahimi-Horn MC und Pouyssegur J, 2005; Wang GL et al., 1995).

Das quantitativ erhöhte HIF-Protein steigert proportional seine Wirkung (Berta M et al., 2004; Brahimi-Horn MC und Pouyssegur J, 2005; Carmeliet P und Jain RK, 2000), wie z.B. auf die Transkriptionsrate des Erythropoetins (EPO) Genes. Zusätzlich zum Einfluss von  $O_2$  wird die Stabilität und Aktivität von HIF-1 $\alpha$  durch Interaktionen mit verschiedenen Proteinen wie pVHL-, P53- und p300/CBP-, sowie durch posttranslationale Modifikationen, Hydroxylierungen, Acetylierungen und Phosphorylierungen reguliert. Vor 20 Jahren ging man davon aus, dass hypoxische Verhältnisse die Bildung von HIF verursachen und dadurch die Expression des VEGF's induzieren (Shweiki D et al., 1992).

Während der Tumorangiogenese resultiert rapides Wachstum der Tumorzellen aus schnellem Absinken der Sauerstoffkonzentration. Die bevorzugt im Zentrum des Tumors entstehende Hypoxie induziert pro-angiogene Faktoren (Berta M et al., 2004). So beeinflusst HIF-1 $\alpha$  z.B. die posttranslationalen Modifikationen des VEGF's. (Berta M et

al., 2004). In einer anderen Studie wird dagegen beschrieben, dass eine HIF-1 $\alpha$  Überexpression eine günstige Prognose für orale Plattenepithelkarzinome (T1 und T2) darstellt (Fillies T et al., 2005).

#### 1.4 Fragestellung

Folgende Fragestellungen liegen dieser Arbeit zugrunde:

- Ist ein Tiermodell mit einer steuerbaren und messbaren Gewebshypoxie möglich? Kann später hierin der Effekt antiangiogener „neuer“ Substanzen überprüft werden?
- Hat die Hypoxie einen Einfluss auf die Entwicklung und das Wachstum des Transitionalzellkarzinoms?
- Kann die Therapie mit Erythropoietin die Sauerstoffanreicherung im Tumor- sowie gesunden Gewebe steigern?
- Wird das Verhalten des Transitionalzellkarzinoms durch die Therapie mit dem Erythropoietin beeinflusst?
- Kann die Tumorangiogenese und somit das Wachstum eines Urothelkarzinoms durch verbesserte Oxygenierung kontrolliert werden?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Die Studie gliederte sich in zwei Vorversuche und einen Hauptversuch: Vorversuch 1 zur Etablierung einer durch Bestrahlung induzierbaren Anämie, Vorversuch 2 zur Findung der Tumorzellkonzentration.

#### 2.1.1 Erster Vorversuch: Erzeugung einer steuerbaren und messbaren Gewebshypoxie in einem Tiermodell

Der erste Vorversuch sollte die Frage beantworten, ob es möglich ist, ein Tiermodell mit einer steuerbaren und messbaren Gewebshypoxie zu erzeugen. Es wurden 2 Gruppen mit insgesamt 20 Wistar Ratten gebildet: „EPO-Gruppe“ (n=10) und „Kontroll-Gruppe“ (n=10).

Die Ratten aus der EPO-Gruppe wurden mit Erythropoietin behandelt. Die subkutane Injektion von Erythropoietin erfolgte 3x / Woche mit 1000 IE / kg Körpergewicht (in Kurznarkose mit Isofluran) beginnend 2 Wochen vor Ganzkörperbestrahlung bis 4 Wochen nach Bestrahlung. Im Vergleich mit anderen Optionen zur Erzeugung der Anämie bei der Ratte erweist sich die Radiotherapie als schnell und effektiv.

Sämtliche Tiere wurden 2 Wochen nach Versuchsbeginn einer Ganzkörperbestrahlung mit 5 Gy zugeführt. Eine venöse Blutentnahme wurde wöchentlich bei allen Tieren mittels Punktion einer Schwanzvene in Isofluran-Kurznarkose durchgeführt. EPO-Gruppe und Kontrollgruppe wurden statistisch mittels t-test (nach Student) auf signifikante Unterschiede geprüft.

#### 2.1.2 Zweiter Vorversuch: Erzeugung eines orthotopen subkutanen Tumormodells bei der Ratte, Bestimmung der optimalen Tumorzellzahl

Der zweite Vorversuch wurde durchgeführt, um eine optimale Tumorzellzahl für ein orthotopes subkutanes Tumormodell zu ermitteln. 10 Wistar Ratten wurden in 5 Gruppen

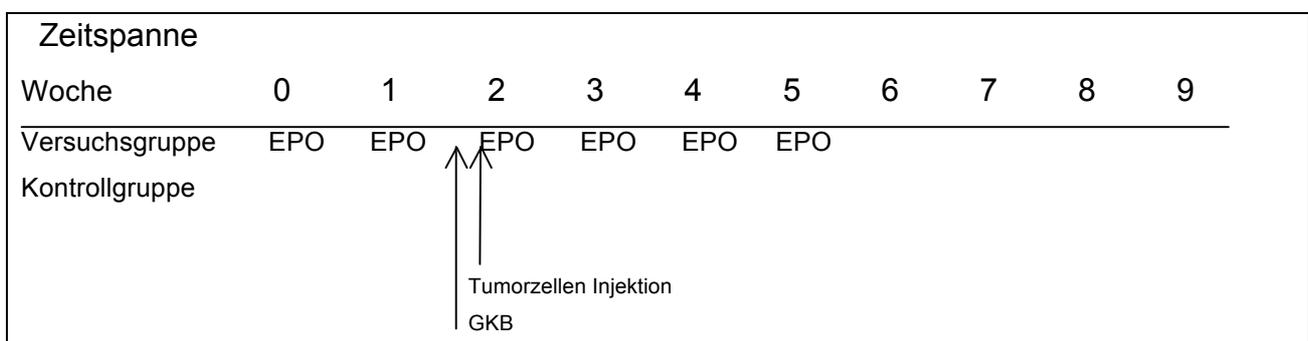
unterteilt. Der Versuch dauerte insgesamt 7 Wochen. Am Ende des Versuchs wurden alle Tiere getötet.

Um die Bedingungen des Hauptversuchs zu simulieren, wurden sämtliche Tiere einer Ganzkörperbestrahlung mit 5 Gy zugeführt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde allen Tieren an der Flanke subkutan Tumorzellensuspension in verschiedenen Konzentrationen gemäß der Gruppeneinteilung injiziert: Gruppe 1 –  $1 \times 10^6$ ; Gruppe 2 –  $2,5 \times 10^6$ ; Gruppe 3 –  $4 \times 10^6$ ; Gruppe 4 –  $5 \times 10^6$ ; Gruppe 5 –  $7,5 \times 10^6$ . Einmal wöchentlich erfolgte die Messung des Tumolvolumens.

### 2.1.3 Hauptversuch

Im Hauptversuch wurden 40 Wistar Ratten in 2 Gruppen unterteilt: „EPO-Gruppe“ (n=20) und „Kontroll-Gruppe“ (n=20).

Die Ratten aus der EPO-Gruppe wurden mit Erythropoietin behandelt. Die subkutane Injektion von Erythropoietin erfolgte 3 x / Woche mit 1000 IE / kg Körpergewicht (in Kurznarkose mit Isofluran) beginnend 2 Wochen vor Ganzkörperbestrahlung bis 4 Wochen nach der Bestrahlung (Abbildung 3). Eine venöse Blutentnahme wurde wöchentlich bei allen Tieren mittels Punktion einer Schwanzvene in Isofluran-Kurznarkose durchgeführt. Außerdem wurden bei den Tieren 1 x / Woche die Körpermaße und die Futteraufnahme gemessen.



**Abbildung 3:** Design des Hauptversuches.

Sämtliche Tiere wurden 2 Wochen nach Versuchsbeginn einer Ganzkörperbestrahlung (GKB) mit 5 Gy zugeführt. Am nächsten Tag nach der GKB wurde allen Tieren die NBT-II Tumorzellen mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^6$  subkutan injiziert.

Ab der ersten Woche des Versuches wurde ein Mal wöchentlich bei allen Tieren die Sauerstoffsättigung im gesunden Gewebe und ab der fünften Woche im Tumorgewebe mittels perkutanem Laserspektrometrie gemessen.

In der ersten (Anfang des Experiments), fünften (maximales Tumolvolumen) und neunten (Versuchende) Wochen erfolgte bei jedem Tier eine Blutentnahme unter Isoflurannarkose. Das Blut wurde in Serumröhrchen (*Microvette 200&500, Sarsted AG & Co., Nürnberg*) aufgefangen und nach einer Wartezeit von mindestens zwei Stunden lang bei 10000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und für weitere Untersuchungen bei -20 °C eingefroren. Ferner fanden diese Proben in der Expressionsanalyse des VEGF und HIF-1 $\alpha$  die Verwendung.

Am Ende des Versuches wurden alle Tiere unter Inhalationsnarkose getötet. Die vorhandenen Tumoren wurden reseziert und in Formalinlösung asserviert.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 70 männliche Wistar Ratten (*Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland*) eingesetzt. Alle Tiere wurden im Haus der experimentellen Therapie (*House for Experimental Therapy, Universitätsklinikum Bonn, Deutschland*) gehalten. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns betrug das Tiergewicht durchschnittlich 250 g.

Die Tiere wurden in normierten Makrolonkäfigen der Größe 4 auf Standardeinstreu (*Altromin, Firma Altrogge, Lage*) für Labortiere gehalten. Die Raumtemperatur bei einer Luftfeuchtigkeit von 50-55% betrug 18-20 °C. Der Tag-Nachtzyklus betrug 12 Stunden, wobei die Tagphase von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr andauerte und mit Kunstlicht (400 Lux) aufrechterhalten wurde. Es wurde eine Standard-Diät für Ratten und Mäuse der Firma *Altromin GmbH (Lage)* in Pelletform gefüttert, Futter und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Mindestens einmal wöchentlich wurden die Ratten in neue Käfige

umgesetzt. Ebenfalls einmal wöchentlich wurde das Trinkwasser erneuert und Futterpellets nachgefüllt.

*Versuchsgenehmigung Aktenzeichen 50.203.2-BN 29, 15/03/Bez. Reg. Köln*

## 2.2.2 Tumorzellen

Als Tumorzellen kam die autologe Wistar Ratten Blasenkarzinomzelllinie NBT-II (*European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK*) zur Anwendung. Ursprünglich wurde diese Zelllinie von der Arbeitsgruppe (Toyoshima K et al., 1971) durch eine Behandlung der Wistar Ratten mit N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine erzeugt.

Jeweils 3 Wochen vor den Versuchen wurde die Blasentumorzelllinie NBT-II dreimal wöchentlich (montags, mittwochs und freitags), jeweils  $1 \times 10^6$  in 10 ml Kulturmedium in Gewebekulturflaschen ( $75\text{cm}^2$ ) umgesetzt. Jeweils zum Ende einer Woche erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums.

Für die Umsetzung der Zellen wurden folgende Reagenzien verwendet:

- 5ml Trypsin/EDTA (*Biochrom AG seromed*) 100ml 10 x Trypsin / EDTA Lösung (0,5%/0,2% in 10xPBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) + 900ml aqua dest.
- 190  $\mu\text{l}$  Tryptanblau (Lösung 0,4%, Firma Sigma)
- Kulturmedium, bestehend aus:
  - 500ml RPMI 1640 (BioWhittaker)
  - 50ml inaktivem (30 min bei  $56^\circ\text{C}$ ) fötalem Kälberserum (Gibco)
  - 5 ml L-Glutamin (AC-Ala-Glu) 200mM (Seromed)
  - 2 ml MEM, nicht essentielle Aminosäuren (Gibco)
  - 2 ml MEM Vitaminen Lösung (Sigma)
  - 2ml Penicillin (10000U/ml) / Streptomycin (10mg/MI) (Gibco)

Angewandte Material und Geräte:

- Vakuumpumpe (Firma Eco Vac) mit Abfallflasche und Schlauchsystem
- $37^\circ\text{C}$  Wasserbad (Firma GFL)
- Tischzentrifuge Universal 32R (Firma Hettich)

- Firma Neubauer „improve Zählkammer“
- 50+ 15 ml Zentrifugenröhrchen (Firma Sarstedt)
- 5, 10, 25 ml serologische Pipetten (gestopft), (Firma Sarstedt)
- Pipettus junior (Firma Hirschmann)
- Pasteurpipetten (Firma Magazin)
- 0,5 ml Reaktionsgefäße (Firma Sarstedt)
- Pipetten P10, P20, P100, P200, P1000 (Firma Gilson)
- Pipettenspitzen 1000+ 200 (Firma MBP)
- CO<sub>2</sub> Inkubator (Firma Nunc)
- Sterile Werkbank (MicroFlow, Firma Nunc)
- Zellkulturflaschen 75T (75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) (Firma Sarstedt)

Vorgehen bei der Passage bzw. Umsetzung:

1. Das Kulturmedium wird abgesaugt.
2. Die Kultur wird mit 3 ml PBS (Firma Seromed) ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gewaschen.
3. Die Spülflüssigkeit wird abgesaugt.
4. Es wird 2,5 ml Trypsin / EDTA (Gibco) zugegeben und das Gefäß in den Brutschrank bei 37°C gestellt.
5. Das Ablösen von Zellen wird in Abständen 3-5 min. am Mikroskop kontrolliert.
6. Um Zellverbände zu trennen, werden einige ml Medium zugegeben und mehrfach mit einer Pipette vorsichtig aufgesaugt.
7. Die Suspension wird in einem geeigneten Röhrchen 5 min. bei ca. 200 x g zentrifugiert.
8. Den Überstand wird abgesaugt.
9. In ein 0,5 ml Reaktionsgefäß werden 190 µl Trypanblau und der Zellsuspension gemischt im Verhältnis 1:20 und von der Suspension ca. 10 µl auf eine Neubauer Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop die lebenden Zellen (ungefärbte) gezählt.
10. Anhand der ermittelten Zellzahl wird das Volumen der Zellen errechnet und mit PBS zusammen pipettiert.

11. Um eine ausreichende Viabilität der Tumorzellen zu gewährleisten, werden die Zellen erst unmittelbar vor der geplanten Injektion präpariert und bis zur Injektion auf Eis inkubiert.

## 2.2.3 Verwendete Substanzen

### 2.2.3.1 Rekombinantes humanes Erythropoietin (rhEPO)

RhEPO (*ERYPO® Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland*) ist eine gentechnologisch erstellte Substanz, deren Wirkmechanismus dem endogenen Erythropoietin gleicht. Es bewirkt im Wesentlichen eine beschleunigte Ausreifung von BFUe (erythroid blast forming units) zu Retikulozyten und wird deshalb zur Substitution der körpereigenen EPO-Produktion, beziehungsweise zur zusätzlichen Stimulierung der endogenen Erythropoese eingesetzt. Es kommt infolgedessen zu einem Anstieg der Retikulozyten-Erythrozytenwerte. Desweiteren können Anstiege der Mono- und Thrombozytenzahlen festgestellt werden, die jedoch in den Normgrenzen bleiben (Markham A und Bryson HM, 1995).

## 2.2.4 Verwendete Geräte

### 2.2.4.1 Narkosegerät

Um eine kurzzeitige, steuerbare Narkose zu erzielen, haben wir uns zu einer Inhalationsnarkose bzw. Maskennarkose entschieden. Als volatile Anästhetika kam Isofluran zur Einsatz, als Trägergas wurde Sauerstoff verwendet.

Es wurde ein offenes Narkosesystem aufgebaut. Ein Isofluran-Verdampfer (*Dräger Vapor 19.3, Dräger Safety AG & Co. KGaA, Luebeck, Deutschland*) wurde auf ein schweres Laborstativ montiert und mittels eines Stücks des Silikonschlauchs mit dem Sauerstoffregler verbunden. Der Schlauchgarnitur bestand aus einem zuleitendem (Sauerstoff O<sub>2</sub>) und ableitendem (Isofluran-O<sub>2</sub>-Gasgemisch) Schenkel. Am distalen Ende

des ableitenden Schenkels wurde eine spezielle Silikonmaske angeschlossen, die 4 cm Großdurchmesser hatte.

#### 2.2.4.2 LEA O2C (Oxygen to see)

Die Messungen wurden mit dem Gerät „O2C“ (LEA Medizintechnik, Giessen, Deutschland) durchgeführt (Abbildung 4). Dieser erlaubt im Gewebe folgende Parameter gleichzeitig zu erfassen:

- die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins ( $SO_2$ ) am venösen Ende der Kapillaren (sog. „letzte Wiese“); diese zeigt die geringste Sauerstoffsättigung des Gewebes und somit die kritischen Werte an;
- die Hämoglobinmenge (rHb) in den Mikro-Gefäßen; diese ist ein Maß für die Füllung der Gefäße mit Hämoglobin (also Blut) und für die Gefäßdichte;
- die Geschwindigkeit des Blutes in der Mikrozirkulation;
- der Blutfluß (BF) in der Mikrozirkulation.



**Abbildung 4:** Oxygen to see (O2C), LEA Medizintechnik GmbH, Giessen, Deutschland

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Anästhesie

Bei allen Versuchen fand eine Inhalationsnarkose Anwendung. Es stand ein Narkosegerät mit Isofluran als Narkosegas und medizinischem Sauerstoff als Trägergas zur Verfügung.

Um eine initiale Sedierung zu erlangen, wurde das Tier in einen speziellen Glassbehälter mit Isofluran getränkten Tüchern platziert. Nach dem Eintritt in das Toleranzstadium – die Tiere lagen im Behälter und atmeten regelmäßig – wurde eine Ratte entnommen und mit der Schnauze in eine spezielle Silikonmaske geschoben. Durch die Maske wurde das Isofluran-O<sub>2</sub>-Gemisch zugeleitet. Zum Aufrechterhalten der Narkose wurde 2-2,5 Vol% Isofluran eingesetzt. Isofluran Konzentration musste jedem Tier angepasst werden. Die Flußrate des O<sub>2</sub> wurde auf 0,5-1 l/Min eingestellt.

Nach Intervention (z.B. Blutentnahme) wurde die Ratte in einen Käfig zurückgelegt und während der kurzen Aufwachphase beobachtet.

### 2.3.2 Blutabnahme und Messung von Blutparametern

Die Blutabnahme erfolgte bei allen Tieren wöchentlich unter Allgemeinanästhesie mit Isofluran aus der lateralen Schwanzvene (Abbildung 5). Zur Erzeugung einer lokalen Hyperämie wurde Finalgon Extra Stark Salbe (*Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Deutschland*) verwendet.



**Abbildung 5:** Punktion der Schwanzvene bei der Ratte.

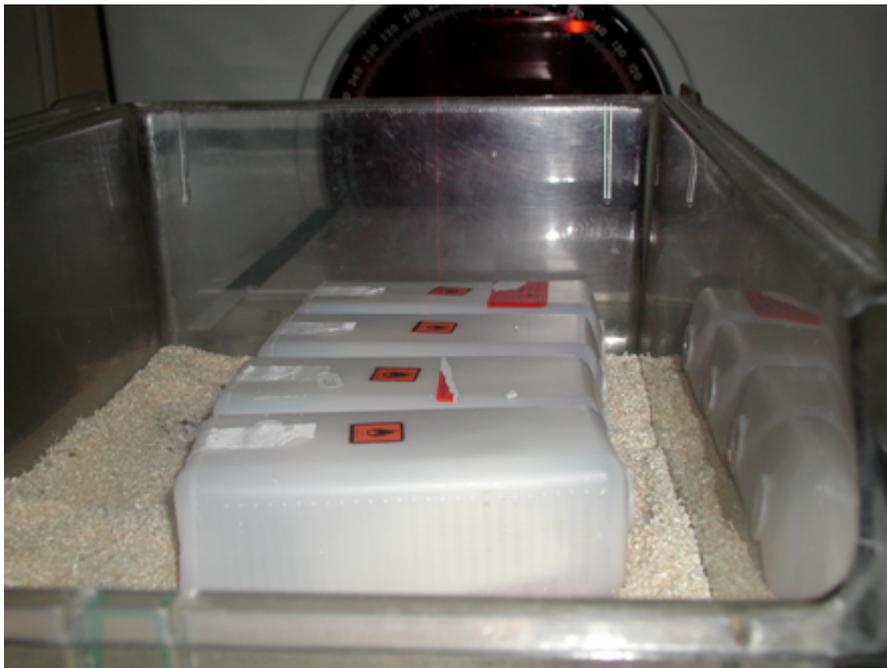
Folgende Blutparameter wurden bestimmt und ausgewertet:

- Leukozyten
- Erythrozyten
- Haemoglobin
- Haematokrit
- Mittleres Zellvolumen / Mean cellular volume (MCV)
- Mittleres Zellhaemoglobin / Mean cellular haemoglobine (MCH)
- Mittlere Zellhaemoglobinkonzentration / Mean cellular haemoglobin concentration (MCHC) Thrombozyten
- Mittleres Trombozytenvolumen / Mean platelet volume (MPV)

Alle Messungen fanden im Labor der klinischen Biochemie der Universitätskliniken Bonn mit Hilfe eines SYSMEX XE-2100 Hämatologiesystem (*SYSMEX Deutschland, Langefeld, Deutschland*) statt.

### 2.3.3 Ganzkörperbestrahlung

Sämtliche Tiere wurden einer Ganzkörperbestrahlung ausgesetzt. Damit es eine ausreichende Knochenmarksuppression eingetreten ist, wurde eine Dosis von 5 Gy (Stuben G et al., 2001) ausgewählt. Die Bestrahlung wurde in der Abteilung der Strahlentherapie der radiologischen Universitätsklinik Bonn durchgeführt (*Linearbeschleuniger Siemens Mevatron MD2; Siemens AG, Deutschland*). Das Bestrahlungsfeld betrug 25x30 cm. Es wurde jeweils 5 Ratten gleichzeitig bestrahlt. Um eine Homogenität der applizierten Strahlendosis zu erreichen, wurde jedes Tier in einen Plastikbehälter mit Maßen 8x7x18 cm platziert (Abbildung 6). Auf eine Narkose wurde verzichtet. Zur Optimierung der effektiven Dosis auf das blutbildende Knochenmark wurden jeweils 2,5 Gy von oben und unten appliziert.



**Abbildung 6:** Die Bestrahlung der Ratten.

### 2.3.4 Die Therapie mit Erythropoetin

Die subkutane Applikation von Erythropoietin (*ERYPO® Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland*) erfolgte 3 x / Woche mit 1000 IE / kg Körpergewicht beginnend 2 Wochen

vor Ganzkörperbestrahlung bis 4 Wochen nach der Bestrahlung ohne Narkose. Das Medikament wurde mit 0,9 % NaCl verdünnt bzw. gelöst, so dass die Lösung 1 ml Volumen nicht überschritt. Die Injektion erfolgte mit einer 1 ml Spritze und einer 26 G-Nadel (0,45 x 23 mm) subkutan in die Flanke.

### 2.3.5 Tumorzelleninjektion (NBT-II)

Die auf Eis bereitgestellten in PBS suspendierten Zellen wurden mittels einer 1 ml-Spritze aufgezogen. Die Injektion von 0,5ml Suspension erfolgte subkutan in Narkose mit einer 26 G-Nadel (0,45 x 23 mm) in die Flanke.

### 2.3.6 Tumolvolumenmessung

Bei allen Tieren wurde einmal pro Woche das Tumolvolumen ermittelt. Die Größe der subkutan wachsenden Raumforderung wurde mittels eines Messschiebers protokolliert. Das Volumen des Tumors wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Tumolvolumen (mm}^3\text{)} = \text{Tumurlänge (mm)} \times \text{Tumorbreite (mm)} \times \text{Tumorhöhe (mm)} \times \pi/6$$

### 2.3.7 Messprinzip des O<sub>2</sub>C, Messung der O<sub>2</sub>-Sättigung im Tumor und im subkutanen Gewebe

Die Technologie des O<sub>2</sub>C basiert auf zwei physikalischen Prinzipien. Zum einen die Weißlicht-Spektroskopie (manchmal auch Spektrometrie oder Reflektions-Spektroskopie genannt) und zum anderen das Laser-Doppler-Verfahren. Mit einer Sonde wird gleichzeitig Weißlicht (Wellenlänge von 500 bis 800 nm) und Laserlicht (Wellenlänge 830 nm) in das Gewebe eingebracht. Das Licht breitet sich diffus im Gewebe aus. Die Photonen werden im Gewebe in alle Richtungen gestreut. Einige dieser Photonen finden einen Weg zurück an die Gewebeoberfläche und werden von der Messsonde erfasst. Wenn das Weißlicht mit Erythrozyten wechselwirkt, wird ein Teil des Lichtspektrums absorbiert. Das Licht nimmt die Farbe des Hämoglobins an. Diese Farbe ist ein Maß für die Sauerstoffsättigung der Erythrozyten.

Trifft das einfallende Laserlicht auf bewegte Erythrozyten, so erfährt dieses Licht eine Frequenzverschiebung (sog. Doppler Shift oder Dopplerverschiebung). Die Dopplerverschiebung ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Erythrozyten. Die Summe aller Erythrozyten und deren Geschwindigkeit ist ein Maß für den Blutfluß (Volumenstrom) im komplexen Kapillarnetz. Im Vergleich zur Ultraschallmessung ist es hier nicht notwendig, das Gefäß zu finden und dessen Querschnittsfläche zu ermitteln.

Die Messtiefe des O2C wird hauptsächlich durch den benutzten Sondentyp und die optischen Eigenschaften des Gewebes bestimmt. Dabei bestimmt bei den Sonden der Abstand von beleuchtender Glasfaser und detektierender Glasfaser (sog. Separation) die mögliche Messtiefe der Sonden. Der Weg des Lichtes von Beleuchtung zur Detektion kann als bananenförmiger Bereich gedacht werden. Dabei liegt der Weg der meisten zurück gestreuten Photonen innerhalb dieser Bananenform. Je größer die Separation nun wird, desto größer wird auch diese Form und somit auch die Ursprungstiefe zurück gestreuter Photonen (sprich die Detektionstiefe).

In einer Kurznarkose wurde die Sauerstoffsättigung über dem Tumorgewebe und über gesundem subkutanen Gewebe bei jedem Tier gemessen. Es wurden jeweils fünf Werte pro Gewebeart pro Tier erfasst und ein resultierender Mittelwert daraus errechnet.

### 2.3.8 Tötung und Sektion der Ratten

Alle überlebenden Ratten wurden am Ende des Experiments (Experimentdauer 10 Wochen) getötet. Die Tötung den Tieren erfolgte durch Inhalation der Isofluran (bis zu 5 Vol %). Diese wurde bis zum Eintritt sicherer Todeszeichen (Pulslosigkeit, Atemstillstand, völlige Atonie) appliziert.

Unmittelbar nach der Tötung der Tiere wurde die Sektion durchgeführt. Bei der Sektion wurden die 2 großen Körperhöhlen eröffnet: zunächst das Abdomen und später der Thorax. Zur Sektion wurde zunächst ein Längsschnitt von Symphyse bis Sternum vorgenommen. Anschließend wurde das Peritoneum dargestellt und eröffnet. Zuerst wurde die Aorta dargestellt, punktiert und 9 ml Blut entnommen (Serum). Danach wurde Leber, Niere, Harnblase und Harnleiter auf neoplastische Veränderungen untersucht. Dazu wurden die genannten Organe in situ betrachtet und manuell abgetastet. Makroskopisch verdächtige Befunde wurden zur histologischen Abklärung asserviert und

mit Formalin fixiert. Abschließend wurde die Milz sowie das Peritoneum auf Anzeichen einer Tumorausbreitung untersucht. Nach Eröffnung des Thorax wurden Herz und Lunge nach den gleichen Prinzipien untersucht und ggf. asserviert.

### 2.3.9 Histologie

Von den makroskopisch sichtbaren subkutanen Raumforderungen wurden Schnittpräparate angefertigt. Die Formalin-fixierte Präparate wurden entwässert und in Paraffin eingebettet und dann mit der bekannten Hämalaun-Erythrosin-Technik (H.E.) gefärbt. Bei dieser Färbemethode stellen sich insbesondere die Zellkerne (Chromatin) dunkelblau dar. Anschließend wurden alle Präparate durch zwei Mitarbeiter untersucht.

### 2.3.10 Immunhistochemie

#### 2.3.10.1 Immunhistochemische Färbung

Das Tumor-Gewebe wurde entfernt und in einer 4 % Formalin-Lösung im Laufe der Nacht fixiert und gewässert. Weiterhin wurden die Proben in einem automatischen Gewebeverarbeiter Microm STP-120 platziert und in Paraffin eingebettet. Es wurden 3-5  $\mu$  dicke Gewebeschnitten angefertigt und auf Objektträger angebracht. Das Färbeverfahren wurde gemäß den Empfehlungen des LSAB-KIT [Labeled-Streptavidin-Biotin (Staining/Methode), DAKO, Hamburg, Deutschland] durchgeführt. Nachher folgten eine Deparaffinisierung des Gewebes im Dimethylbenzol und eine Entwässerung durch abgestuften Alkohol und Wasser. Das Demaskieren des Antigens wurde mit 10-mM-Natriumzitat-Puffer in einer Mikrowelle (600W, 10 Minuten) durchgeführt. Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde mit der 3 % Wasserstoffperoxid-Lösung neutralisiert. Der spezifische primäre Antikörper oder die negative Kontrolle wurde über Nacht mit 4 ° C ausgebrütet. Antikörper gegen VEGF (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) und HIF-1 $\alpha$  (Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien) wurden jeweils 1:10 oder 1:100 verdünnt. Nach der Inkubation des biotin-konjugierten sekundären Antikörpers wurde der avidin biotin Enzym-Reagens angewandt. AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) Substrat wurde

entwickelt, bis gewünschte Intensität der Färbung vorkam. Vor der Bedeckung des Objektträgers wurde eine Kontrastfärbung mit Hematoxylin durchgeführt.

#### 2.3.10.2 Auswertung

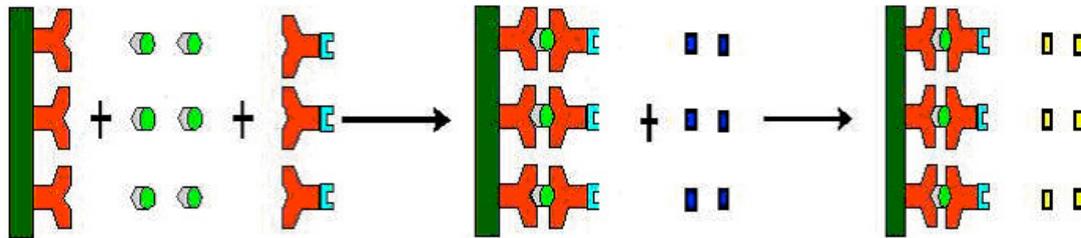
Die Auswertung von allen angefertigten Präparaten wurde von jeweils 3 Untersuchern durchgeführt. Die Immunreaktivität von VEGF und HIF-1 $\alpha$  wurde mit einem semiquantitativen Zählsystem ausgewertet, das sich auf die Färbintensivität und den Prozentanteil der positiven Zellen basiert. Die Intensivität der Färbung wurde wie folgend beurteilt: 0 – keine Färbung, 1 – schwache Färbung, 2 – moderate Färbung, 3 – starke Färbung.

Das positiv gefärbte Areal wurde in Vergleich zu ganzem Blickfeld bewertet und beurteilt wie folgt: 0 – nichts, 1 – 0%-25%, 2 – 25%-50%, 3 - >50% positive Zellen. Die Multiplikation den beiden Messwerten ergab Immunhistochemische (Score) (Yang J et al., 2006).

#### 2.3.11 Quantitative Bestimmung des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) im Serum mittels Sandwich-ELISA

##### 2.3.11.1 Prinzip des Sandwich-ELISA (Enzymimmunoassay)

Die ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Technik basiert auf dem Antikörper-Sandwich-Prinzip (Abbildung 7). Man erfasst damit quantitativ Antigen- oder Antikörperkonzentrationen. Dabei werden Mikrotiterplatten mit einem gegen die zu bestimmende Substanz gerichteten mono- bzw. polyklonalen Antikörper (immunosorbent) beschichtet. Anschließend werden diesen Platten die Proben, Standards und Kontrollen zugegeben, wobei die zu bestimmende Substanz von den Antikörpern gebunden wird. Nach Inkubation und Waschschritten wird ein zweiter polyklonaler enzymgekoppelter Antikörper, der sogenannte Detektionsantikörper, zugegeben. Durch die wiederholten Waschvorgänge werden nicht hochaffin gebundene Proteine entfernt.



Antikörper + Antigen + enzymgekoppelter → Sandwich-Komplex + Chromogenlösung → Farbreaktion Antikörper

**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Sandwich-ELISA

Es folgt eine zweite Inkubation und weitere Waschvorgänge, nach welcher die Mikrotiterplatten mit einer Chromogenlösung beschichtet werden, die wiederum mit dem Enzym reagiert. Durch die Zugabe einer Säurelösung wird die Farbreaktion gestoppt und die Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen, wobei die Absorption der Konzentration der zu bestimmenden Substanz direkt proportional ist.

### 2.3.11.2 Durchführung

Zum Erfassen des VEGF Status wurden die Blutproben in erster Woche (baseline), fünfter Woche (maximale Tumolvolumen) und neunter Woche (Ende der Experimente) entnommen. Die VEGF-Konzentration im Serum wurde mittels eines ELISA-Sandwich-Assays gemessen (*Quantikine® DY564 Rat VEGF Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA*). Die 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit einem polyklonalen VEGF-Antikörper beschichtet.

Durchführungsvorschrift:

1. Herstellen einer Standardreihe: Pipettieren von 500 µl Standard (2000 pg/ml VEGF in Proteinpuffer) in 500 µl Diluent (tierisches Serum) zum Verdünnen auf 1000 pg/ml, weiteres Verdünnen auf 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml und 31,2 pg/ml.
2. 100 µl Assaypuffer (Proteinpuffer [BSA]) in jede Vertiefung geben.

3. Pipettieren der VEGF-Standards 1-8 und des Probenmaterials in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Dabei je 100  $\mu$ l des Materials in die Vertiefung einbringen und für 2h bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Die Vertiefungen absaugen und 3x mit 400  $\mu$ l Waschlösung (gepufferte Surfactantlösung) waschen, auf Fließpapier trocken klopfen.
5. 200  $\mu$ l Antikörper-Enzym-Konjugat (an Meerrettichperoxidase [HRP] gekoppelte polyklonale VEGF-Antikörper) in jede Vertiefung geben, 2h bei Raumtemperatur inkubieren.
6. 3x mit 400  $\mu$ l Waschlösung waschen und auf Fließpapier trocken klopfen.
7. 200  $\mu$ l Chromogenlösung (Tetramethylbenzidin [TMB] mit Wasserstoffperoxid) in jede Vertiefung geben und für 25min bei Raumtemperatur inkubieren.
8. 50  $\mu$ l Stopplösung (2 N Schwefelsäure) in jede Vertiefung geben.
9. Absorption der Lösung nach 30min bei 450nm messen.

### 2.3.12 Statistische Analyse

Von allen gewonnenen Daten wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet sowie Minimum, Maximum und der Median ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test nach Student. Ein p-Wert von kleiner als 0,05 wurde als signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der Vorversuche

##### 3.1.1 Erster Vorversuch

Insgesamt 5 Tiere der Kontrollgruppe boten 14 Tage nach Ganzkörperbestrahlung eine offenbar letale Anämie. In der EPO-Gruppe wurden keinerlei Auffälligkeiten beobachtet. Ein Tier verstarb bei der initialen Blutabnahme vor Strahlentherapie aufgrund eines Narkosezwischenfalles.

Die Gabe von EPO führte verglichen zur Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg des Hb und Hkt bereits vor Ganzkörperbestrahlung (Tabelle 6 und 7).

Woche	Kontrollgruppe		EPO-Gruppe		Signifikanz (p)
	Hb (mg / dl)	SD	Hb (mg / dl)	SD	
0	15,3	0,4	15,3	1,4	n.s.
1	15,7	0,5	16,9	1	<0,005
2	15,3	0,7	19,7	0,9	<0,005
3	16,3	0,4	22,07	0,9	<0,005
4	15,5	0,7	22	1	<0,005
5	11,1	3,3	18,64	1,6	<0,005
6	12,05	3,5	18,467	3	<0,005
7	14	3,1	20,5	2,1	<0,005
8	14,8	1,3	19,1	1,6	<0,005
9	13,8	0,7	14,6	0,9	<0,005

**Tabelle 6:** Hb (mg / dl), Mittelwert, Standardabweichung (SD)

Woche	Kontrollgruppe		EPO-Gruppe		Signifikanz (p)
	Hkt(%)	SD	Hkt(%)	SD	
0	45	1	45	4	n.s.
1	43	10	52	3	<0,05
2	44	2	60	3	<0,005
3	47	1	64	2	<0,005
4	45	2	62	3	<0,005
5	32	9	53	4	<0,005
6	35	11	54	8	<0,005
7	42	8	60	6	<0,005
8	44	4	58	5	<0,005
9	42	2	44	3	<0,005

**Tabelle 7:** Hkt (%), Mittelwert, Standardabweichung (SD)

Eine initiale Leukozytose der mit EPO behandelten Tiere wurde als reaktiv auf wiederholte subkutane Injektion interpretiert (Tabelle 8). Die Injektionsorte waren jedoch bei der klinischen Inspektion jederzeit reizlos. Ein Einfluss auf die Thrombozyten wurde nicht beobachtet (Tabelle 9). Ebenso fanden sich zwischen den Gruppen keinerlei Unterschiede hinsichtlich Futtermittelverbrauch und Gewichtszunahme.

Woche	Kontrollgruppe		EPO-Gruppe		Signifikanz (p)
	Leu(G / l)	SD	Leu(G / l)	SD	
0	12,3	3,1	9,9	2,2	n.s.
1	10,5	2,8	16,75	4	<0,005
2	10,3	2,2	12,7	1,8	<0,05
3	2,8	0,9	2,9	1,1	n.s.
4	2	0,7	1,79	0,8	n.s.
5	1,2	1,1	1,14	0,9	n.s.
6	2,6	1,9	3,7	1,7	n.s.
7	7,3	3,1	6,4	1,9	n.s.
8	7,5	2,3	5,9	1,4	n.s.
9	5,4	1,4	4,5	1,8	n.s.

**Tabelle 8:** Leukozyten (G / l), Mittelwert, Standardabweichung (SD)

Woche	Kontrollgruppe		EPO-Gruppe		Signifikanz (p)
	Throm (G / l)	SD	Throm (G / l)	SD	
0	700	215	597	266	n.s.
1	852	132	877	98	n.s.
2	810	96	731	89	n.s.
3	661	46	418	108	<0,005
4	59	32	48	13	n.s.
5	36	35	22	9	n.s.
6	260	313	160	90	n.s.
7	491	343	597	69	n.s.
8	893	139	633	137	<0,05
9	934	192	724	116	<0,05

**Tabelle 9:** Thrombozyten (G / l), Mittelwert, Standardabweichung (SD)

Die Ganzkörperbestrahlung führte zu einer Myelosuppression (Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie) in der Kontrollgruppe und zu ebenfalls einer Myelosuppression (Leukopenie und Thrombozytopenie) in der EPO-Gruppe mit einem Nadir zwischen dem 14. und 21. Tag nach Strahlentherapie. Als Zeichen der allgemeinen Strahlenwirkung fand sich eine Stagnation des Körpergewichtes über 2 Wochen nach Strahlentherapie analog zu passager abnehmendem Futterverbrauch. 14 Tage später fand sich jedoch wiederum eine kontinuierliche Zunahme des Körpergewichtes entsprechend der "Wachstumskurve" vor Strahlentherapie.

In der EPO-Gruppe fand sich ein zur Kontrollgruppe analoger Abfall des roten Blutbildes jedoch auf Ebene signifikant höherer Absolutwerte. Dies begründete sich in der bereits vor Strahlentherapie begonnenen Therapie durch EPO und Anstieg des Hb auf Absolutwerte um 20mg/dl vor Strahlentherapie.

### 3.1.2 Zweiter Vorversuch

Bereits nach einer Woche bot sich in der ersten Gruppe nur eine minimale Reaktion auf Tumorzelleninjektion. Man konnte keine Veränderungen an der Injektionsstelle sehen und einen etwa stecknadelkopfgroßen Knoten tasten. Wie wir nach 6 Wochen feststellen konnten, handelte es sich höchstwahrscheinlich um eine lokale Entzündung.

In Gruppe 2 wurde ebenfalls kein adäquates Tumorwachstum beobachtet. Man konnte zwar in ersten 2 Wochen eine erbsengroße Raumforderung tasten, jedoch verkleinerte sich diese aber in folgenden Wochen und nach 6 Wochen verschwand sie völlig.

Das Tumorwachstum in Gruppe 3 war ausgeprägt. Schon nach ersten zwei Wochen erreichte das Tumolvolumen bei beiden Ratten Werte von  $0,65 \text{ cm}^3$  und  $0,72 \text{ cm}^3$ . In der dritten Woche erreichten die Tumoren deren maximales Volumen von  $1,74 \text{ cm}^3$ . In darauf folgenden Wochen beobachteten wir eine Abnahme der Größe der Raumforderungen. So dass sich 6 Wochen nach Versuchsbeginn das Tumolvolumen bis  $0,15 \text{ cm}^3$  reduzierte.

Das optimale Tumorwachstum ergab sich in der Gruppe 4. Schon nach 2 Wochen nach der Zelleninjektion boten sich solide Tumoren mit dem Volumen bis zu  $2,5 - 2,8 \text{ cm}^3$  an. So wie auch in anderen Gruppen wurde das Maximum an Volumen in der dritten Woche erreicht. Am Ende der 6 Woche wurden die Werte von  $0,54$  und  $0,67 \text{ cm}^3$  ermittelt.

In der Gruppe 5 wuchsen Tumoren am aggressivsten. In der 2. Woche beobachteten wir Raumforderungen mit dem Volumen von bis zu  $3,6 - 4,0 \text{ cm}^3$ . In der dritten Woche konnte man eine Rötung der Haut über die Geschwulst sehen. In der nächsten Woche exulzerierten die Tumoren. Außerdem boten die Tiere ein auffälliges Verhalten: Sie zeigten sich deutlich unruhig. Es fanden sich in der Gruppe ein abnehmender Futterverbrauch und eine Stagnation des Körpergewichtes. Aufgrund des Gesamteindruckes erfolgten der Ausschluss der Tiere aus dem Vorversuch sowie eine Tötung in Narkose. Während der Sektion wurde nichts auffälliges festgestellt. Wir interpretierten den Zustand der Tiere als Reaktion auf ausgeprägte Tumorlast.

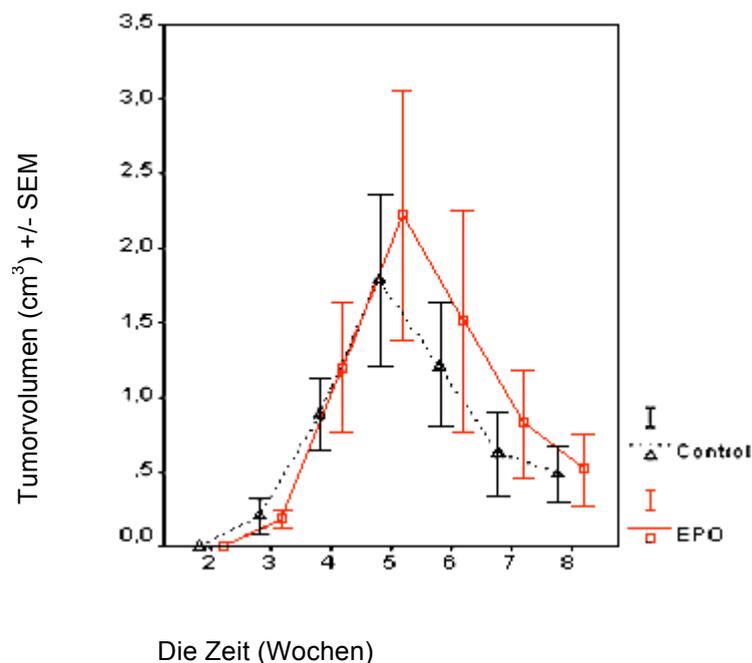
Bei der Ratte 1 konnte nach Injektion der Tumorzellsuspension in darauffolgenden Wochen eine geringe Verdickung des Cutis festgestellt werden, die in der 6 Woche verschwand. Ratte 2 und 3 zeigten etwas ausgeprägte Reaktion jedoch ohne merkbares Tumorwachstum. Bei der Ratte 4 ließ sich in der ersten und zweiten Woche eine ca. erbsengroße subkutane Raumforderung tasten. In der dritten und vierten Woche reduzierte sich jedoch das Volumen des Geschwulstes.

## 3.2 Ergebnisse des Hauptversuches

### 3.2.1 Tumorwachstum

Das maximale Tumolvolumen wurde in der fünften Woche nach dem Versuchsbeginn ermittelt. Der Mittelwert betrug für die EPO-Gruppe  $2.2 \pm 0.4 \text{ cm}^3$  und für die Kontrollgruppe  $1.7 \pm 0.3 \text{ cm}^3$ .

In den folgenden Wochen bis zum Ende des Versuches reduzierte sich das Tumolvolumen kontinuierlich (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Tumorwachstumskurve. Standardfehler des Mittelwertes (SEM), EPO-Gruppe (EPO), Kontrollgruppe (Control)

Der Vergleich der Mittelwerten von beiden Gruppen stellte sich als nichtsignifikant dar (Tabelle 10).

Woche	Kontrollgruppe	EPO-Gruppe	p
0	0	0	n.s.
1	0	0	n.s.
2	0	0	n.s.
3	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	n.s.
4	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.2	n.s.
5	1.7 ± 0.3	2.2 ± 0.4	n.s.
6	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.3	n.s.
7	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2	n.s.
8	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	n.s.
9	0	0	n.s.

**Tabelle 10:** Das Tumorzvolumen (cm<sup>3</sup>) bei Ratten.

### 3.2.2 Erniedrigte Hb-Werte und Hypoxie (perkutane Messungen), Behandlung mit EPO

#### 3.2.2.1 Der Hämoglobingehalt

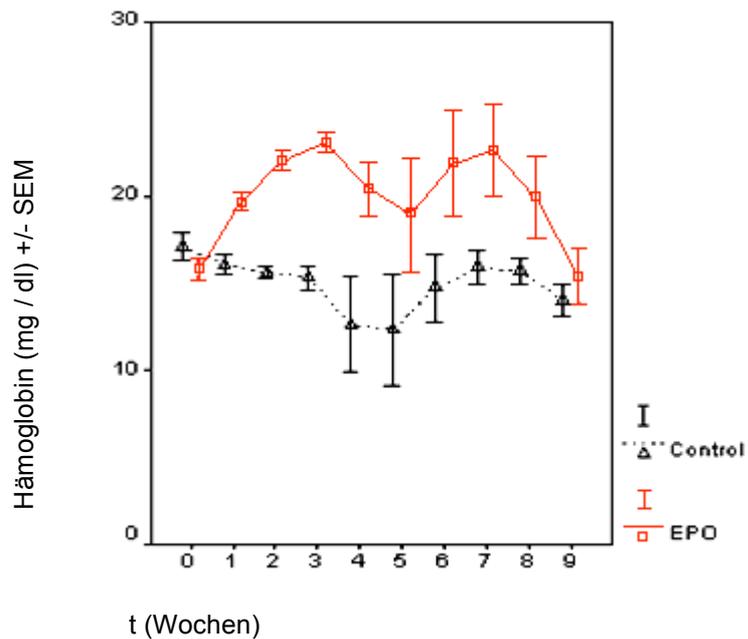
In unserem ersten Vorversuch konnten wir zeigen, dass eine Ganzkörperbestrahlung der Ratte sich als ein geeignetes Verfahren zur Erzeugung einer Anämie mittels radiogener Myelosuppression eignet. 5 Gy erwiesen sich als effektive Dosis.

Nach 2 Wochen nach der Ganzkörperbestrahlung entwickelte sich in der Kontrollgruppe einen Abfall des Hämoglobingehaltes bis zum Mittelwert von 12,3±0,7 mg / dl. In der EPO-Gruppe fand es sich ein zur Kontrollgruppe analoger Abfall des roten Blutbildes jedoch auf Ebene signifikant höherer Absolutwerte. Dies begründete sich in der bereits vor Strahlentherapie begonnen Therapie durch Erythropoietin und Anstieg des Hb auf Mittelwert von 19,8±0,1 mg / dl vor Strahlentherapie. Aus der Tabelle 11 kann man einen signifikanten Unterschied der Hämoglobinkonzentration zwischen der Kontroll- und EPO-Gruppe entnehmen.

Woche	Kontrollgruppe	EPO-Gruppe	p
0	17.1 ± 0.2	15.8 ± 0.1	n.s.
1	16.1 ± 0.1	19.8 ± 0.1	<0,05
2	15.6 ± 0.1	22.1 ± 0.1	<0,05
3	15.3 ± 0.1	23.1 ± 0.1	<0,05
4	12.7 ± 0.6	20.4 ± 0.5	<0,05
5	12.3 ± 0.7	19.0 ± 1.0	<0,05
6	14.7 ± 0.4	21.9 ± 0.9	<0,05
7	15.9 ± 0.2	22.7 ± 0.8	<0,05
8	15.7 ± 0.2	20.0 ± 0.7	n.s.
9	14.0 ± 0.2	15.4 ± 0.5	n.s.

**Tabelle 11:** Hämoglobin (mg / dl) bei Ratten.

In der Abbildung 9 kann man sehen, dass die niedrigsten Hämoglobinwerte in der fünften Woche nach dem Versuchsbeginn erreicht wurden. In den folgenden Wochen wurde die Myelosuppression rekonvaleszent.



**Abbildung 9:** Der Vergleich der Mittelwerte der Hämoglobinkonzentration in der Kontroll- und EPO-Gruppe. Standardfehler des Mittelwertes (SEM), EPO-Gruppe (EPO), Kontrollgruppe (Control)

### 3.2.2.2 O<sub>2</sub>-Sättigung im gesunden Gewebe und Tumorgewebe

Die perkutanen Messungen des Oxygenierungsstatus im gesunden Gewebe und Tumorgewebe zeigten verschiedene Ergebnisse. In der EPO-Gruppe verhinderte die Behandlung mit Erythropoietin eine Gewebshypoxie nach der Ganzkörperbestrahlung. In der fünften, sechsten und siebten Woche nach dem Versuchsbeginn waren die Werte signifikant ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 12).

Woche	Kontrollgruppe	EPO-Gruppe	p
0	81.7 ± 1.31	81.9 ± 1.34	n.s.
1	80.7 ± 1.0	82.3 ± 1.4	n.s.
2	80.7 ± 0.9	81.8 ± 1.34	n.s.
3	79.4 ± 1.9	80.2 ± 2.1	n.s.
4	76.9 ± 0.9	79.5 ± 0.9	n.s.
5	58.7 ± 2.0	64.9 ± 1.8	<0,05
6	73.3 ± 1.6	78.3 ± 1.79	<0,05
7	73.8 ± 0.9	76.3 ± 2.36	<0,05
8	76.7 ± 1.0	80.7 ± 1.28	n.s.
9	75.0 ± 0.8	75.8 ± 1.46	n.s.

**Tabelle 12:** Oxygenierung im gesunden Gewebe (%) bei Ratten. (Mittelwerte. 5 Messungen / Tier / Woche)

Die Sauerstoffsättigung im Tumorgewebe in beiden Gruppen konnte wegen zu geringer Tumorgöße erst ab der 5. Woche nach Versuchsbeginn gemessen werden. Der Vergleich der Werte zwischen beiden Gruppen stellte sich als nicht signifikant dar (Tabelle 13).

Woche	Kontrollgruppe	EPO-Gruppe	p
0	k. Werte verfügbar	k. Werte verfügbar	
1	k. Werte verfügbar	k. Werte verfügbar	
2	k. Werte verfügbar	k. Werte verfügbar	
3	k. Werte verfügbar	k. Werte verfügbar	
4	k. Werte verfügbar	k. Werte verfügbar	
5	53.0 ± 4.5	64.1 ± 4.49	n.s.
6	57.1 ± 2.8	64.3 ± 2.57	n.s.
7	58.9 ± 2.4	64.2 ± 2.72	n.s.
8	56.7 ± 4.61	57.8 ± 2.71	n.s.
9	59.4 ± 3.6	63.0 ± 2.48	n.s.

**Tabelle 13:** Oxygenierung im Tumorgewebe (%) bei Ratten. (Mittelwerte. 5 Messungen / Tier / Woche)

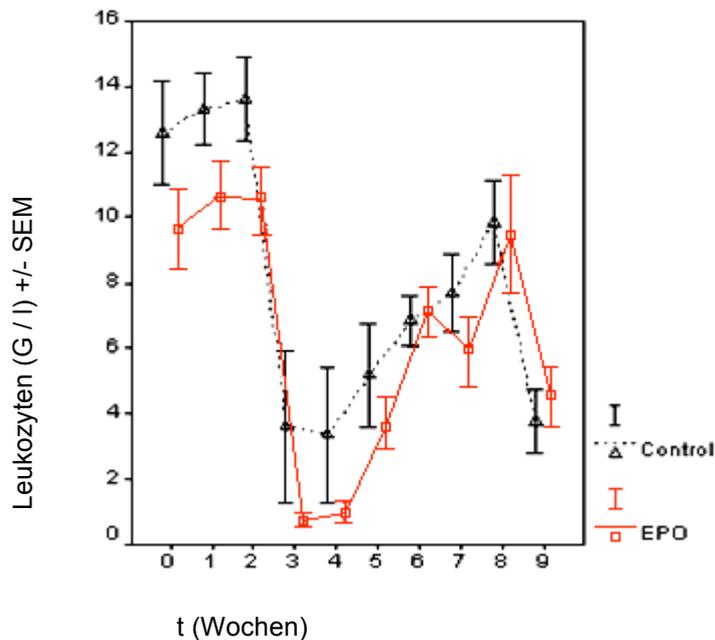
## 3.2.2.3 Radiogene Leukopenie

Da die Ganzkörperbestrahlung eine Myelosuppression bewirkt, fand es sich auch eine ausgeprägte Leukopenie bei allen Tieren. In der ersten Woche nach der Bestrahlung erreichte die Leukozytenzahl in der Kontrollgruppe den Mittelwert von  $3,6 \pm 1,2$  G / l und in der EPO-Gruppe  $0,7 \pm 0,1$  G / l (der niedrigste Mittelwert). Der niedrigste Mittelwert für die Kontrollgruppe von  $3,4 \pm 1,0$  G / l wurde in der vierten Woche nach dem Versuchsbeginn beobachtet.

Im weiteren Verlauf kam es nach ca. 6 Wochen zu einer Normalisierung des Blutbildes in beiden Gruppen. Wie wir auch in unserem ersten Vorversuch sehen konnten, fand es sich keinen signifikanten Unterschied in Leukozytenzahl zwischen der Kontrollgruppe und der EPO-Gruppe (Tabelle 14, Abbildung 10).

Woche	Kontrollgruppe	EPO-Gruppe	p
0	$12.6 \pm 0.8$	$9.7 \pm 0.6$	n.s.
1	$13.3 \pm 0.5$	$10.7 \pm 0.5$	n.s.
2	$13.6 \pm 0.7$	$10.5 \pm 0.5$	n.s.
3	$3.6 \pm 1.2$	$0.7 \pm 0.1$	n.s.
4	$3.4 \pm 1.0$	$1.0 \pm 0.2$	n.s.
5	$5.2 \pm 0.8$	$3.7 \pm 0.4$	n.s.
6	$6.8 \pm 0.4$	$7.1 \pm 0.4$	n.s.
7	$7.7 \pm 0.6$	$5.9 \pm 0.5$	n.s.
8	$9.9 \pm 0.6$	$9.5 \pm 0.9$	n.s.

**Tabelle 14 :** Leukozyten (G / l) bei Ratten.



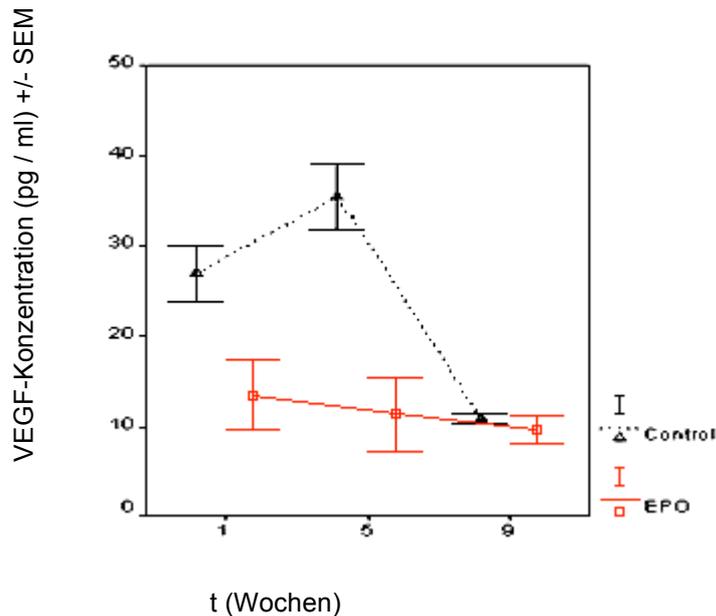
**Abbildung 10:** Der Vergleich der Mittelwerte der Leukozytenzahl in der Kontroll- und EPO-Gruppe. Standardfehler des Mittelwertes (SEM), EPO-Gruppe (EPO), Kontrollgruppe (Control)

### 3.2.3 Die Messung der Konzentration des VEGF's im Serum

In der EPO-Gruppe wurde ein VEGF von  $13,54 \pm 3,88$  pg / ml zu Versuchsbeginn gemessen. Die Werte sanken im Verlauf bis  $9,71 \pm 1,47$  pg / ml am Ende (neunte Woche). In der Kontrollgruppe dagegen zeigten sich in Relation hierzu erhöhte Werte. Der ermittelte Mittelwert betrug am Versuchsbeginn  $29,6 \pm 3,17$  pg / ml. Die maximale Konzentration des VEGF's in der Kontrollgruppe von  $35,36 \pm 3,69$  pg / ml wurde in der fünften Woche gemessen (Abbildung 11). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war in der fünften Woche signifikant (Tabelle 15).

Woche	Kontrollgruppe	EPO-Gruppe	p
0	$29,6 \pm 3,17$	$13,54 \pm 3,83$	n.s.
5	$35,36 \pm 3,69$	$11,37 \pm 4,08$	<0,05
9	$10,87 \pm 0,64$	$9,71 \pm 1,47$	n.s.

**Tabelle 15:** Konzentration des VEGF's im Rattenserum (pg / ml). (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung )



**Abbildung 11:** Der Vergleich der Mittelwerte der VEGF- Konzentration in der Kontroll- und EPO-Gruppe. Standardfehler des Mittelwertes (SEM), EPO-Gruppe (EPO), Kontrollgruppe (Control)

### 3.2.4 Immunhistochemische Bestimmung des HIF's und des VEGF's

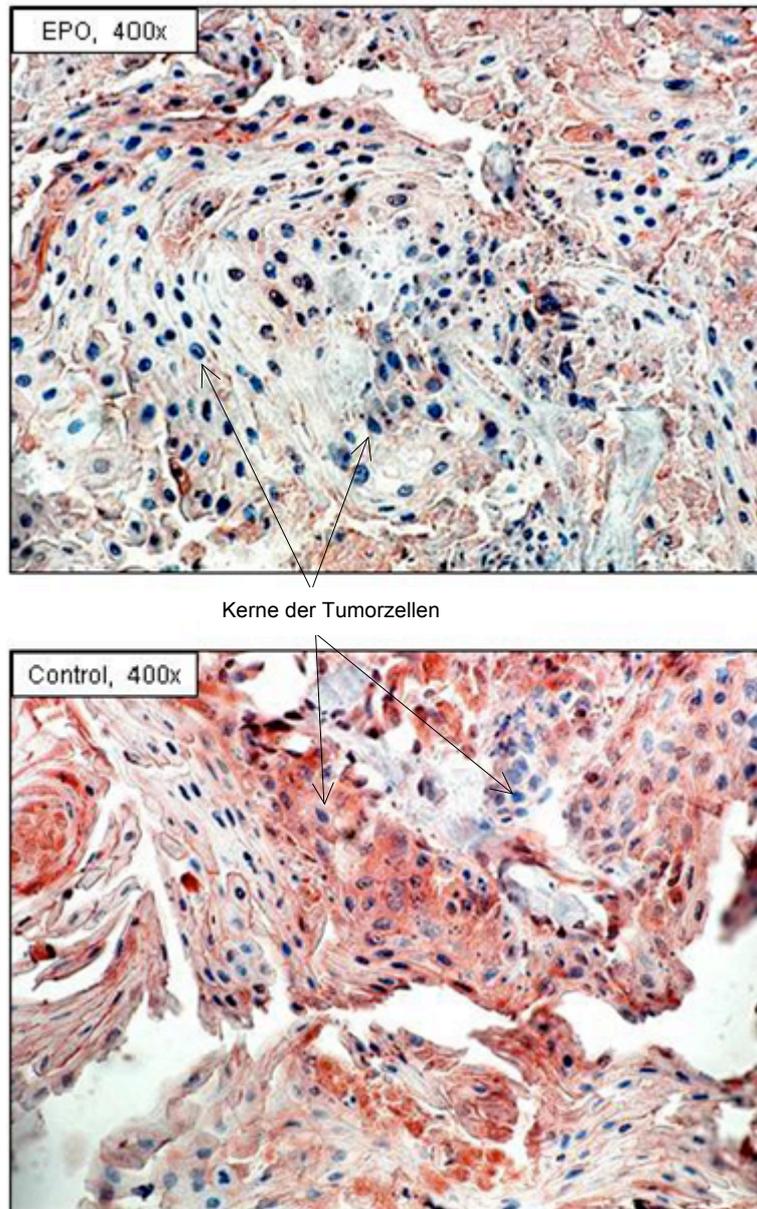
#### 3.2.4.1 HIF-1 Alpha

Eine starke Färbung für HIF wurde in Tumorregionen mit einer ausgeprägten mitotischen Aktivität und in der Nähe zu den Nekrosearealen beobachtet. Die hoch differenzierten Tumorzellen stellten dagegen keine HIF Expression (siehe Abbildung 12). Die ermittelten Mittelwerte betragen für die Kontrollgruppe 16.3 und für die EPO-Gruppe 10.8. Der Unterschied zwischen EPO-Gruppe und Kontrollgruppe war signifikant ( $p < 0.05$ ).

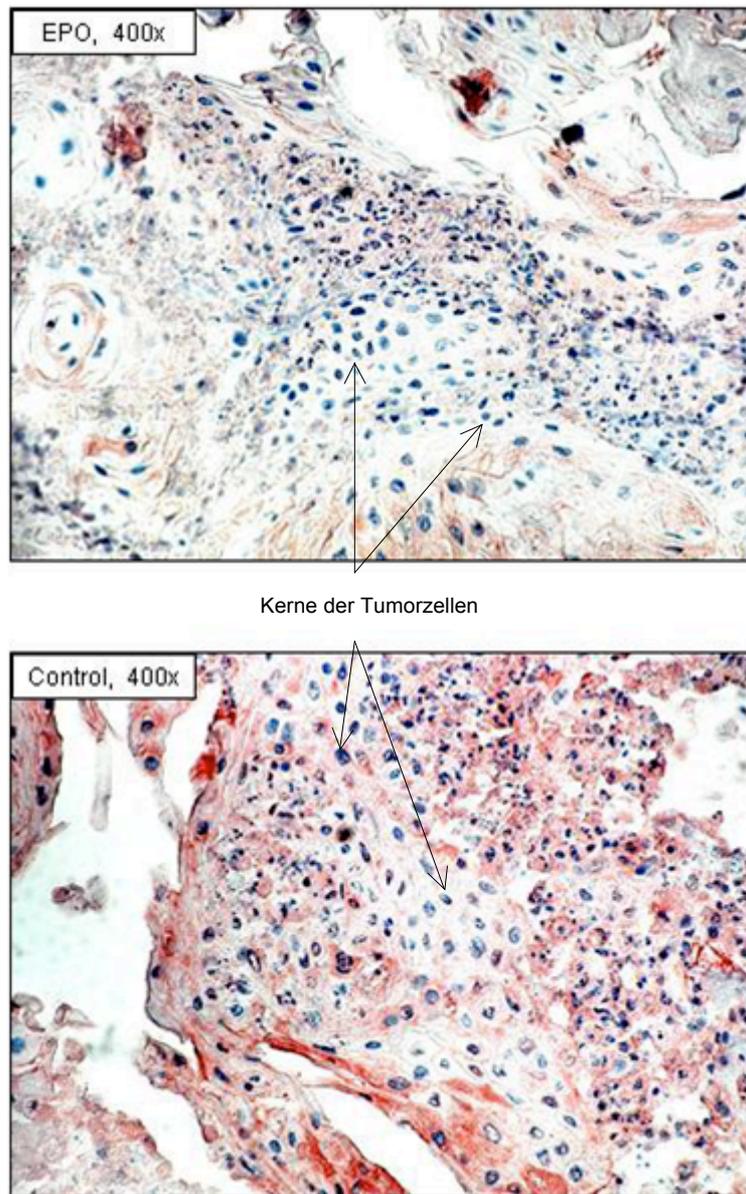
#### 3.2.4.2 VEGF

Das zytoplasmatische VEGF wurde mit der ansteigenden Intensität in den zentralen Tumorregionen und Arealen weit weg entfernten von den Blutgefäßen beobachtet. Die Tumorzellen mit der mitotischen Aktivität zeigten eine starke Färbung im Vergleich zu den inaktiven hochdifferenzierten Tumorzellen (siehe Abbildung 13). Die Tumorpräparate

von der Kontrollgruppe zeigten eine mehr intensive Färbung für VEGF im Vergleich zu der EPO-Gruppe (Mittelwerte: 22.3 vs. 16.2,  $p < 0.05$ ).



**Abbildung 12:** Die Immunperoxidasefärbung für HIF-1 $\alpha$  im Tumorgewebe: EPO-Gruppe (oben) und Kontrollgruppe (unten), starke Färbung in den Zellen mit Mitose



**Abbildung 13:** Die Immunperoxidasefärbung für VEGF im Tumorgewebe: EPO-Gruppe (oben) und Kontrollgruppe (unten), starke Färbung in den Zellen mit Mitose

## 4. Diskussion

Einer der häufig untersuchten Mechanismen in der Tumorentwicklung und Tumorprogression heutzutage ist die Angiogenese. Durch die Blockierung der Gefäßwachstumsfaktoren (VEGF, EGF) erreicht man in einer Kombination mit der konventionellen Chemotherapie eine Regression des Tumors und verlängert somit das Überleben der Patienten. Mehrere Substanzen sind noch Gegenstand der Forschung oder bereits in die Therapiekonzepte bei vielen Malignomen implementiert (Cardones AR und Banez LL, 2006). Die Tumorphoxie als eine Folge der Erkrankung oder der Radiochemotherapie induziert durch eine Überexpression des HIF's-1 $\alpha$  die Angiogenese und spielt somit eine entscheidende Rolle im Tumorprogress. Auch für das Transitionalzellkarzinom konnte dieser Zusammenhang *in vitro* gezeigt werden (Fechner G et al., 2005).

Zielsetzung dieser Studie war das Verhalten des Urothelkarzinoms unter hypoxischen Bedingungen *in vivo* zu untersuchen. Darüberhinaus wurde versucht, durch Behandlung mit EPO Korrektur des O<sub>2</sub>-Magels im Tumorgewebe zu erreichen und damit das Tumorwachstum zu verlangsamen.

### 4.1 Steuerbares Anämiemodell bei der Ratte

Im ersten Vorversuch wurde ein Modell der steuerbaren Anämie bei einer Ratte entwickelt und seine Reproduzierbarkeit überprüft. Für die Erzeugung der Anämie kam die Ganzkörperbestrahlung (GKB) mit insgesamt 5 Gy zum Einsatz. Die Hälfte der Ratten wurde mit EPO behandelt. Als Folge der Radiotherapie entwickelte es sich bei Tieren der Kontrollgruppe eine Panzytopenie mit konsekutiver Abfall der Hb-Konzentration (cHb) (Nadir zwischen 14 und 21 Tag nach der Bestrahlung). Durch eine Therapie mit EPO konnte radiogene Anämie ohne wesentliche Nebenwirkungen verhindert werden. In der Literatur finden sich nur wenige vergleichbare Methoden. Die Arbeitsgruppe *Thews et al.* konnte durch einmalige Gabe von Carboplatin (45 mg / kg KG i.v.) bei Ratte Hb-Abfall um 30 % vom Ausgangswert bewirken. Im gleichen Versuch wurde gezeigt, dass die Entwicklung der Anämie mittels EPO verhindern werden kann (Thews O et al., 1998). Gleich gute Ergebnisse konnten bei Ratten durch Erzeugung der

hämorrhagischen Zystitis beobachtet werden (Kelleher DK et al., 1995). Auch die Ganzkörperbestrahlung etablierte sich als geeigneter Verfahren für die Induktion der Anämie in einem Tiermodell (Stuben G et al., 2001).

Hier kann behauptet werden, dass eine GKB mit 5 Gy und eine Behandlung mit EPO ein steuerbares Anämiemodell in einer Ratte ermöglichen und vergleichbare Ergebnisse mit anderen Verfahren zeigen.

#### 4.2 Orthotopes subkutanes Tumormodell

Die Erschaffung eines subkutanen orthotopen Tumormodells wurde im zweiten Vorversuch dieser Studie durchgeführt. Durch Applikation von verschiedenen Konzentrationen den Tumorzellen nach GKB wurde eine passende Zellzahl für optimales Tumorwachstum ermittelt. Ein ähnliches TCC Tumormodell in einer Ratte findet sich in der aktuellen Literatur nicht. *Abaza et al.* führten eine intraperitoneale Instillation der TCC Tumorzellsuspension (AY 27) bei Fischer Ratten durch und konnten eine erfolgreiche Implantation und Wachstum der Tumoren erreichen (Abaza R et al., 2006). In einer anderen Studie instillierten die Autoren eine TCC Zellkultur (UMUC-3) in die Harnblase der athymischen „nackten“ Ratten. Das Wachstum konnte zystoskopisch bestätigt werden (Bolenz C et al., 2007). Außer durch eine direkte Zellimplantation kann ein Urothelkarzinom durch orale Zufuhr einer karzinogenen Substanz induziert werden (Kong C et al., 2005). Im Hinblick auf subkutane, also heterotope, Modelle konnte durch Applikation von Sarkomzellen eine Implantation und Tumorwachstum gesichert werden (Kelleher DK et al., 1995).

Die Lage der Tumoren in unserem Modell verschafft einerseits Vorteile in Hinsicht auf die Verlaufskontrolle, ist aber auch einen limitierenden Faktor. So ist die Zugänglichkeit für verschiedene Messungen, wie Tumorgrossee Erfassung oder Messung der O<sub>2</sub>-Sättigung vereinfacht. Andererseits ist die Gefäßversorgung in der Subkutis nicht optimal. Dies kann sich in einem limitierten Tumorwachstum widerspiegeln.

### 4.3 Messbarkeit der Hypoxie im Tiermodell, Vergleich der Messmethoden

Zur Objektivierung der O<sub>2</sub>-Anreicherung im Gewebe (subcutis) und im Tumor in unserem Modell verwendeten wir eine perkutane Laserspektrometrie. Damit konnte die O<sub>2</sub>-Sättigung im (Gewebs-)Hämoglobin ermittelt werden. Die perkutane Laserspektrometrie hat sich bereits in vielen klinischen und experimentellen Studien bewährt. Eine andere Möglichkeit, den Oxygenierungsstatus des Gewebes zu überprüfen, wird durch elektrochemisches Verfahren realisiert (Gleichmann U und Lübers DW, 1960). Hiermit kann der pO<sub>2</sub> in tieferen Gewebeabschnitten mit Nadelelektroden gemessen werden (Dunst J et al., 2001; Rudat V et al., 2001). Diese Methode findet bereits seit mehreren Jahrzehnten eine breite Anwendung, gilt aber als invasiv. In unserem Modell konnten wir mittels perkutaner Laserspektrometrie ohne mechanischen Einfluss auf das Gewebe O<sub>2</sub>-Sättigung ermitteln und damit eine Messbarkeit der Hypoxie zeigen.

### 4.4 Oxygenierungsstatus der Geweben, Abklärung von Therapie mit EPO

Die mögliche Steigerung der O<sub>2</sub>-Hämoglobinsättigung im gesunden Gewebe (subcutis) durch die Behandlung des anämischen Tieres mit EPO konnte in unserem Versuch gezeigt werden. Tumoroxygenierung unterschied sich nur gering zwischen beiden Gruppen und war nicht signifikant. Unsere Ergebnisse stimmen jedoch mit den Daten anderer Arbeitsgruppen nicht überein. *Kelleher et al.* konnten durch die subkutane Applikation von EPO eine signifikante Besserung der Oxygenierung der kleinen Tumoren (<1,4 ml) in anämischen Ratten erreichen. Der pO<sub>2</sub> der größeren Tumoren (Sarkom) (>1,4 ml) blieb jedoch ohne Änderungen (Kelleher DK et al., 1995). In einer späteren Arbeit zeigten die Autoren, dass EPO zwar pO<sub>2</sub> in Tumoren (Sarkom) verbessert, jedoch nicht komplett kompensiert (Kelleher DK et al., 1998). Die Auswirkung von EPO auf die Tumoroxygenierung (Mammakarzinom) in nicht anämischen Tieren (Fischer Ratte) wurde bereits untersucht. Hier konnten höhere pO<sub>2</sub>-Werte bei behandelten Tieren ermittelt werden. Der wichtigste Punkt der Arbeit war, dass die Hb-Konzentration mit pO<sub>2</sub> der Tumoren nicht korrelierte (Blackwell KL et al., 2003). Es soll betont werden, dass es sich in allen aufgezählten Studien nicht um ein Urothelkarzinom handelte.

#### 4.5 Hypoxie bedingte Überexpression von HIF-1 $\alpha$ und VEGF's im Urothelkarzinom

Zur Evaluierung des hypoxiebedingten Einflusses auf die Tumorbiologie in unserem Modell wurden sämtliche biochemische und immunhistologische Verfahren angewendet. So bestimmten wir im Serum der Ratten der VEGF Spiegel. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen in der fünften Woche unserer Studie, wobei höhere Werte in der Kontrollgruppe ermittelt wurden. Die Werte korrelierten mit der Gewebshypoxie, niedrigerer Hb-Konzentration (cHb) und maximalem Tumolvolumen. In der Literatur finden sich sämtliche Daten über erhöhten VEGF im Serum bei Patienten mit oberflächlichem bzw. muskelinvasivem Urothelkarzinom im Vergleich zu gesunder Population (Miyake H et al., 1999). Der Unterschied bei hypoxischen und normoxischen Bedingungen wurde *in vivo* bis dato noch nicht untersucht.

Immunhistologisch ließ sich eine signifikante Prävalenz von HIF-1 $\alpha$  und VEGF in Tumoren der Kontrollgruppe im Vergleich zur EPO-Gruppe nachweisen. Die Überexpression von VEGF und HIF beim TCC ist bereits beschrieben (Chai CY et al., 2008; Theodoropoulos VE et al., 2005). Solche Beobachtungen wurden auch in anderen soliden Neoplasien gemacht (Gordan JD und Simon MC, 2007; Semenza GL, 2000; Semenza GL, 2003).

Somit bestätigt sich eine hypoxiebedingte Induktion der Expression von Gefässwachstumsfaktoren im Urothelzellkarzinom. Diese Daten bekräftigen die Ergebnisse aus einer in-vitro Studie (Fechner G et al., 2005). Durch die Behandlung mit EPO kann Gewebshypoxie korrigiert werden und dadurch wird eine Expression der Gefässwachstumsfaktoren gehemmt.

#### 4.6 Auswirkungen der Hypoxie und der Behandlung mit EPO auf das Tumorwachstum

Das maximale Tumolvolumen wurde in der fünften Woche ( $1.7 \pm 0.3 \text{ cm}^3$  Kontrollgruppe,  $2.2 \pm 0.4 \text{ cm}^3$  EPO-Gruppe) der Studie ermittelt. Die Tumoren waren in der EPO-Gruppe minimal grösser, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Gleichzeitig konnten tiefste O<sub>2</sub>-Sättigung des gesunden Gewebes sowie niedrigste Hb-Werte bei allen Tieren gemessen werden. Nach Rekonvaleszenz der Myelosuppression und Normalisierung des Blutbildes mit konsekutiver Verbesserung des Oxygenierungsstatus stellten wir eine

Reduktion der Tumormassen in beiden Gruppen fest. Der Zusammenhang der Tumorhypoxie mit dem Tumolvolumen wurde bereits für Ovarialkarzinom und Plattenepithelkarzinom nachgewiesen (Dunst J et al., 2003; Jiang H und Feng Y, 2006). Für TCC existieren bis jetzt keine Daten. Eine Regression der TumorgroÙe nach Korrektur der Hypoxie wurde ebenso nicht beschrieben.

Bezugnehmend auf unser Modell können auch nutritive Probleme eine Rolle für das Verhalten der Neoplasie spielen. Trotz einer durch Tumor induzierten Angiogenese, kann eine ausreichende Gefäßdichte für stets wachsendes Karzinom in der Subcutis bald nicht mehr ausreichend sein.

Die Förderung des Tumorwachstums durch EPO muss diskutiert werden. Es ist bekannt, dass viele Tumoren eine Expression des Erythropoetin-Rezeptors (EPOR) aufweisen. Dies wurde in vielen experimentellen Arbeiten bestätigt. In 2 randomisierten klinischen Studien, in denen eine Anämie bei Patienten mit Mamma- und Kopf-Hals-Karzinom mit EPO behandelt wurde, zeigte sich bei therapierten Patienten sogar ein vermindertes Überleben und erhöhte Tumorprogression (Henke M et al., 2003; Leyland-Jones B et al., 2005). Es folgten Vermutungen, dass EPO bei Tumoren mit EPOR eine Auswirkung auf das Wachstum hat. Eine Analyse von etlichen *in vitro* und *in vivo* Studien, die Expression von EPOR in vielen Malignomen untersuchten und ein Einfluss von EPO auf deren Verhalten prüften, zeigte, dass in keinem Tierexperiment EPO die Tumorprogression förderte (Sinclair AM et al., 2007). Demnach kann behauptet werden, dass EPO in unserem Tumormodell keinen Einfluss auf das Tumorwachstum hatte.

#### 4.7 Einfluss der Hämoglobinkonzentration und Immunitätsstatus auf Verhalten des Urothelkarzinoms in unserem Tiermodell

Es ist bekannt, dass eine Tumorhypoxie durch eine Reihe der Faktoren entstehen kann. Die wichtigsten sind Perfussion (akute Hypoxie), Diffusion und Anämie (Vaupel P und Harrison L, 2004). Außerdem wurde bereits eine Abhängigkeit der Tumoroxygenierung von der Hämoglobinkonzentration (cHb) in Experimentaltumoren, Mammakarzinomen, Kopf-Hals-Tumoren und Plattenepithelkarzinomen der Cervix und der Vulva untersucht. Experimentelle und klinische Studien zeigen eindeutig, dass niedrige cHb-Werte in der Regel mit einer schlechten Tumoroxygenierung einhergehen. Die Zunahme des Hb-

Gehalts führt zu einer signifikanten Verbesserung der Tumoroxygenierung. Die höchsten medianen  $pO_2$ -Werte bzw. niedrigsten hypoxischen Fraktionen in Plattenepithelkarzinomen findet man im Bereich der (geschlechtsspezifischen) Normalwerte (ca. 14 g/dl bei Frauen und etwa 15 g/dl bei Männern). Bei Überschreiten dieses „optimalen“ Bereichs nimmt die  $O_2$ -Versorgung des Tumorgewebes wieder ab. Bei anämischen Patienten verschlechtert sich aufgrund der eingeschränkten  $O_2$ -Transportkapazität der Oxygenierungsstatus der Tumoren. Bei relativ hohen Hb-Konzentrationen tritt ebenfalls eine zunehmende Verschlechterung der  $O_2$ -Versorgung auf, die im Wesentlichen auf eine Perfusionsstörung infolge eines stark gestiegenen viskösen Strömungswiderstands des Bluts im „chaotischen“ Gefäßbett der Tumoren zurückzuführen ist (Vaupel P et al., 2006). In unserem Modell lagen cHb Werte bei den mit EPO behandelten Tieren zwischen der zweiten und der achten Woche der Studie über 19 mg/dl bei einem initialem Wert von 16 mg/dl. Durch Polyzytämie mit konsekutiv hoher Blutviskosität konnten Perfusionsstörungen zur Verstärkung bzw. Persistenz der Tumorhypoxie führen. Bezugnehmend auf die aus klinischen Studien stammenden Daten sollte cHb dem Tumoroxygenierungsstatus angepasst werden und die Ausgangswerte nicht überschreiten.

Ein Einfluss der radiogenen Leukopenie auf TCC in unserem Modell sollte diskutiert werden. Seit den frühen Siebzigern ist es bekannt, dass mononukleäre immunkompetente Zellen aus dem peripheren Blut durch BCG zur Zytotoxizität gegen Urothelkarzinomzellen stimuliert werden können (Perabo FG und Müller SC, 2004; Schellhammer PF et al., 1975). Durch diese Erkenntnisse kann angenommen werden, dass eine Reduktion der Tumormasse in unserem Modell durch die wiedererlangte Immunität nach Aufhebung des maximalen myelosuppressiven Effekts der GKB entstanden ist. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine vergleichbaren Untersuchungen, so dass diese Überlegung nicht bestätigt werden kann. Zur Überprüfung dieser Theorie sollten in der Zukunft athymische oder so genannte „nackte“ Ratten benutzt werden.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde ein *in vivo* Modell mit simulierter reduzierter O<sub>2</sub>-Versorgung des Tumors (TCC) erschaffen und eine Auswirkung der Hypoxie auf Wachstum des Urothelkarzinoms untersucht. Darüberhinaus wurde ein möglicher therapeutischer Effekt von EPO auf das Tumorverhalten evaluiert.

Wir konnten ein subkutanes TCC-Modell in einer Ratte mit steuerbarer und messbarer Hypoxie etablieren. Mit diesem Modell konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der Gefäßwachstumsfaktoren beim TCC mit der O<sub>2</sub>-Sättigung im Tumor signifikant korreliert. Durch die Behandlung mit EPO konnte die Expression von HIF-1 $\alpha$  und VEGF signifikant reduziert werden. Das Wachstum der Tumoren wurde durch EPO nicht beeinflusst. Die Rekonvaleszenz des Blutbildes und Steigerung der O<sub>2</sub>-Versorgung führte zu einer Reduktion des Tumolvolumens.

Bezugnehmend auf die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit erscheint die Behandlung der niedrigeren Hb-Werte im TCC als sinnvoll. Bevor aber eine definitive Aussage gemacht werden kann, sollte diese These in den kontrollierten klinischen Studien überprüft werden.

Das Tiermodell mit steuerbarer und messbarer Hypoxie kann in späteren Untersuchungen verwendet werden, bedarf aber eine Anpassung der cHb der O<sub>2</sub>-Sättigung. Der mögliche Einfluss der Immunität auf subkutane Applikation der Urothelkarzinomzellen in einer Ratte sollte in der Zukunft reevaluiert werden. Hierfür könnten athymische "nackte" Ratten verwendet werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. *Eur.Urol* 2005;48:202-205
2. Abaza R, Keck RW, Selman SH. Intraperitoneal chemotherapy for the prevention of transitional cell carcinoma implantation. *J.Urol.* 2006;175:2317-2322
3. Artz A, Stadler WM, Vogelzang NJ, Zimmerman T, Ryan C. A phase II trial of sequential chemotherapy with docetaxel and methotrexate followed by gemcitabine and cisplatin for metastatic urothelial cancer. *Am.J.Clin.Oncol.* 2005;28:109-113
4. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Bohle A, Palou-Redorta J. EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Eur.Urol.* 2008;54:303-314
5. Badalament RA, Fair WR, Whitmore WF, Jr., Melamed MR. The relative value of cytometry and cytology in the management of bladder cancer: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Semin.Urol.* 1988;6:22-30
6. Bamias A, Mouloupoulos LA, Koutras A, Aravantinos G, Fountzilas G, Pectasides D, Kastritis E, Gika D, Skarlos D, Linardou H, Kalofonos HP, Dimopoulos MA. The combination of gemcitabine and carboplatin as first-line treatment in patients with advanced urothelial carcinoma. A Phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Cancer* 2006a;106:297-303
7. Bamias A, Tiliakos I, Karali MD, Dimopoulos MA. Systemic chemotherapy in inoperable or metastatic bladder cancer. *Ann.Oncol.* 2006b;17:553-561
8. Bellezza I, Bracarda S, Caserta C, Minelli A. Targeting of EGFR tyrosine kinase by ZD1839 ("Iressa") in androgen-responsive prostate cancer in vitro. *Mol.Genet.Metab* 2006;88:114-122

9. Berta M, Brahim-Horn C, Pouyssegur J. [Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha): a breath of fresh air in hypoxia research]. *J Soc.Biol.* 2004;198:113-120
10. Bertz J, Hentschel S, Stabenov R, Giersiepen K, Kaatsch P, Stegmaier Ch, Haberland J, Katalinic A, Ziegler H. *Krebs in Deutschland.* 2006;5:80-83
11. Bichler KH, Becker G, Bokemeyer C, Buck G, Damman F, Feil G, Krause FS, Lahme S, Nelde HJ, Ressler H, Strohmaier WL, Zumbrägel A. Harnblasenkarzinom. Empfehlungen zur Diagnose, Therapie und Nachsorge. 2000;8-27
12. Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Snyder SA, Broadwater G, Farrell F, Jolliffe L, Brizel DM, Dewhirst MW. Human recombinant erythropoietin significantly improves tumor oxygenation independent of its effects on hemoglobin. *Cancer Res.* 2003;63:6162-6165
13. Block T, Kriegmair M, Busch M, Weiss M. Harnblasenkarzinom. 1997;37-73
14. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl.Cancer Inst.* 1995;87:1603-1612
15. Böhle A. Das Harnblasenkarzinom. Diagnostik, organerhaltende Therapie, Rezidivprophylaxe. *Urologe B* 1997;37:400-413
16. Bolenz C, Wenzel M, Cao Y, Trojan L, Hacker A, Arancibia MF, Alken P, Michel MS. Newly developed mini-endoscope for diagnosis and follow-up of orthotopic bladder transitional-cell carcinoma in vivo. *J.Endourol.* 2007;21:789-794
17. Boman H, Hedelin H, Jacobsson S, Holmang S. Newly diagnosed bladder cancer: the relationship of initial symptoms, degree of microhematuria and tumor marker status. *J.Urol.* 2002;168:1955-1959
18. Brahim-Horn MC, Pouyssegur J. The hypoxia-inducible factor and tumor progression along the angiogenic pathway. *Int.Rev.Cytol.* 2005;242:157-213

19. Burch JD, Rohan TE, Howe GR, Risch HA, Hill GB, Steele R, Miller AB. Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. *Int.J Cancer* 1989;44:622-628
20. Campbell SC. Advances in angiogenesis research: relevance to urological oncology. *J Urol* 1997;158:1663-1674
21. Cardones AR, Banez LL. VEGF inhibitors in cancer therapy. *Curr.Pharm.Des* 2006;12:387-394
22. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat.Med.* 2003;9:653-660
23. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998;394:485-490
24. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257
25. Chai CY, Chen WT, Hung WC, Kang WY, Huang YC, Su YC, Yang CH. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression correlates with focal macrophage infiltration, angiogenesis and unfavourable prognosis in urothelial carcinoma. *J.Clin.Pathol.* 2008;61:658-664
26. Clavel J, Cordier S, Boccon-Gibod L, Hemon D. Tobacco and bladder cancer in males: increased risk for inhalers and smokers of black tobacco. *Int.J Cancer* 1989;44:605-610
27. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D, Harris AL. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res.* 1997;57:5281-5285
28. Culine S, Theodore C, De SM, Bui B, Demkow T, Lorenz J, Rolland F, Delgado FM, Longerey B, James N. A phase II study of vinflunine in bladder cancer

patients progressing after first-line platinum-containing regimen. *Br.J.Cancer* 2006;94:1395-1401

29. Daniltschenko DI, Riedl CR, Sachs MD, Koenig F, Daha KL, Pflueger H, Loening SA, Schnorr D. Long-term benefit of 5-aminolevulinic acid fluorescence assisted transurethral resection of superficial bladder cancer: 5-year results of a prospective randomized study. *J Urol* 2005;174:2129-33, discussion
30. Davey P, Merrick MV, Duncan W, Redpath AT. Bladder cancer: the value of routine bone scintigraphy. *Clin.Radiol.* 1985;36:77-79
31. De Santis M, Bachner M. New developments in first- and second-line chemotherapy for transitional cell, squamous cell and adenocarcinoma of the bladder. *Curr.Opin.Urol.* 2007;17:363-368
32. Denzinger S, Burger M, Walter B, Knuechel R, Roessler W, Wieland WF, Filbeck T. Clinically relevant reduction in risk of recurrence of superficial bladder cancer using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis: 8-year results of prospective randomized study. *Urology* 2007;69:675-679
33. Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GN, Harris AL. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br.J Urol* 1994;74:762-766
34. Dominguez-Escrig JL, Kelly JD, Neal DE, King SM, Davies BR. Evaluation of the therapeutic potential of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib in preclinical models of bladder cancer. *Clin.Cancer Res.* 2004;10:4874-4884
35. Dunst J, Stadler P, Becker A, Kuhnt T, Lautenschlager C, Molls M, Haensgen G. Tumor hypoxia and systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck cancers. *Strahlenther.Onkol.* 2001;177:469-473

36. Dunst J, Stadler P, Becker A, Lautenschlager C, Pelz T, Hansgen G, Molls M, Kuhnt T. Tumor volume and tumor hypoxia in head and neck cancers. The amount of the hypoxic volume is important. *Strahlenther.Onkol.* 2003;179:521-526
37. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am.J.Surg.Pathol.* 1998;22:1435-1448
38. Fechner G, Dederichs F, Schmidt D, Muller S, Vaupel P, Albers P. Hyperoxia-induced improvement of the in vitro response to gemcitabine in transitional cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2005;25:3413-3418
39. Fillies T, Werkmeister R, van Diest PJ, Brandt B, Joos U, Buerger H. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC.Cancer* 2005;5:84-93
40. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv.Cancer Res.* 1985;43:175-203
41. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N.Engl.J Med.* 1971;285:1182-1186
42. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-447
43. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp.Med.* 1971;133:275-288
44. Gilbert HA, Logan JL, Kagan AR, Friedman HA, Cove JK, Fox M, Muldoon TM, Lonni YW, Rowe JH, Cooper JF, Nussbaum H, Chan P, Rao A, Starr A. The natural history of papillary transitional cell carcinoma of the bladder and its treatment in an unselected population on the basis of histologic grading. *J.Urol.* 1978;119:488-492

45. Gleichmann U, Lübers DW. Measurement of the oxygen tension in gases and fluids with the Pt-electrode with special reference to measurement in the blood. *Pflugers Arch.Gesamte Physiol Menschen.Tiere.* 1960;271:431-455
46. Gordan JD, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 2007;17:71-77
47. Grote J, Pohl U. Der Sauerstoff im Gewebe: Substrat, Signal und Noxe. 2005;29:818-819
48. Han KS, Joung JY, Kim TS, Jeong IG, Seo HK, Chung J, Lee KH. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin combination regimen as salvage chemotherapy for patients with advanced or metastatic transitional cell carcinoma after failure of gemcitabine and cisplatin chemotherapy. *Br.J.Cancer* 2008;98:86-90
49. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-364
50. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat.Rev.Cancer* 2002;2:38-47
51. Hartmann A, Moser K, Kriegmair M, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R. Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am.J.Pathol.* 1999;154:721-727
52. Hartmann A, Schlake G, Zaak D, Hungerhuber E, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R. Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder. *Cancer Res.* 2002;62:809-818
53. Hautmann H. *Urologie.* 2001;2:204-217
54. Hautmann RE, Gschwend JE, de Petriconi RC, Kron M, Volkmer BG. Cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: results of a surgery only series in the neobladder era. *J.Urol.* 2006;176:486-492

55. Henke M, Laszig R, Rube C, Schafer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;362:1255-1260
56. Herr HW. Routine CT scan in cystectomy patients: does it change management? *Urology* 1996;47:324-325
57. Hueper W, Wiley F, Wolfe H. Experimental production of bladder tumors in dogs by administration of beta-naphtylamine. *J Industr Hyg Toxicol* 1938;20-46
58. Inoue K, Slaton JW, Davis DW, Hicklin DJ, McConkey DJ, Karashima T, Radinsky R, Dinney CP. Treatment of human metastatic transitional cell carcinoma of the bladder in a murine model with the anti-vascular endothelial growth factor receptor monoclonal antibody DC101 and paclitaxel. *Clin.Cancer Res.* 2000;6:2635-2643
59. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 1998;12:149-162
60. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307:58-62
61. Jakse G, Algaba F, Fossa S, Stenzl A, Sternberg C. Guidelines on Bladder Cancer Muscle-invasive and Metastatic. 2004;9-14
62. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J.Clin.* 2006;56:106-130
63. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007;57:43-66
64. Jiang H, Feng Y. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) correlated with tumor growth and apoptosis in ovarian cancer. *Int.J.Gynecol.Cancer* 2006;16 Suppl 1:405-412

65. Jichlinski P, Forrer M, Mizeret J, Glanzmann T, Braichotte D, Wagnieres G, Zimmer G, Guillou L, Schmidlin F, Graber P, van den BH, Leisinger HJ. Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of protoporphyrin IX following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results. *Lasers Surg.Med.* 1997;20:402-408
66. Jichlinski P, Guillou L, Karlsen SJ, Malmstrom PU, Jocham D, Brennhovd B, Johansson E, Gartner T, Lange N, van den BH, Leisinger HJ. Hexyl aminolevulinate fluorescence cystoscopy: new diagnostic tool for photodiagnosis of superficial bladder cancer--a multicenter study. *J Urol* 2003;170:226-229
67. Jichlinski P, Leisinger HJ. Fluorescence cystoscopy in the management of bladder cancer: a help for the urologist! *Urol.Int.* 2005;74:97-101
68. Jocham D. Maligne Tumoren der Harnblase. 1994;49-115
69. Kälble T. Etiopathology, risk factors, environmental influences and epidemiology of bladder cancer. *Urologe A* 2001;40:447-450
70. Kassouf W, Dinney CP, Brown G, McConkey DJ, Diehl AJ, Bar-Eli M, Adam L. Uncoupling between epidermal growth factor receptor and downstream signals defines resistance to the antiproliferative effect of Gefitinib in bladder cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65:10524-10535
71. Kelleher DK, Matthiensen U, Thews O, Vaupel P. Tumor oxygenation in anemic rats: effects of erythropoietin treatment versus red blood cell transfusion. *Acta Oncol.* 1995;34:379-384
72. Kelleher DK, Thews O, Vaupel P. Can erythropoietin improve tumor oxygenation? *Strahlenther.Onkol.* 1998;174 Suppl 4:20-23
73. Kong C, Zhu Y, Sun C, Li Z, Sun Z, Zhang X, Takanaka I. Inhibition of tumor angiogenesis during cisplatin chemotherapy for bladder cancer improves treatment outcome. *Urology* 2005;65:395-399

74. Kriegmair M, Stepp H, Steinbach P, Lumper W, Ehsan A, Stepp HG, Rick K, Knuchel R, Baumgartner R, Hofstetter A. Fluorescence cystoscopy following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid: a new procedure with high sensitivity for detection of hardly visible urothelial neoplasias. *Urol.Int.* 1995;55:190-196
75. Kruger S, Weitsch G, Buttner H, Matthiensen A, Bohmer T, Marquardt T, Sayk F, Feller AC, Bohle A. HER2 overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic implications. *Int.J.Cancer* 2002;102:514-518
76. Kunz M, Ibrahim SM. Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Mol.Cancer* 2003;2:23-
77. Lee LW, Davis E. Gross urinary hemorrhage: a symptom, not a disease. *J.Am.Med.Assoc.* 1953;153:782-784
78. Leissner J. Lymphadenectomy for bladder cancer. Diagnostic and prognostic significance as well as therapeutic benefit. *Urologe A* 2005;44:638-644
79. Leissner J, Ghoneim MA, bol-Enein H, Thuroff JW, Franzaring L, Fisch M, Schulze H, Managadze G, Allhoff EP, el-Baz MA, Kastendieck H, Buhtz P, Kropf S, Hohenfellner R, Wolf HK. Extended radical lymphadenectomy in patients with urothelial bladder cancer: results of a prospective multicenter study. *J.Urol.* 2004;171:139-144
80. Leitlinien DGU. Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms. 1998;Nummer 37:440-457
81. Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, Makhson A, Roth A, Dodwell D, Baselga J, Biakhov M, Valuckas K, Voznyi E, Liu X, Vercammen E. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:5960-5972

82. Lillienfeld A, Levin M. The association of smoking with cancer of the urinary bladder in humans. 1956;98:129-135
83. Loehrer PJ, Sr., Einhorn LH, Elson PJ, Crawford ED, Kuebler P, Tannock I, Raghavan D, Stuart-Harris R, Sarosdy MF, Lowe BA, . A randomized comparison of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study. J Clin.Oncol. 1992;10:1066-1073
84. Markham A, Bryson HM. Epoetin alfa. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in nonrenal applications. Drugs 1995;49:232-254
85. Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Huguet-Perez J, Vicente-Rodriguez J. Upper urinary tract tumors after primary superficial bladder tumors: prognostic factors and risk groups. J.Urol. 2000;164:1183-1187
86. Miller K, Weißbach L. Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Harnblsenkarzinoms der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU). Urologe A 1998;37:440-457
87. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. J.Clin.Oncol. 2006;24:5552-5564
88. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S. Elevation of serum level of vascular endothelial growth factor as a new predictor of recurrence and disease progression in patients with superficial urothelial cancer. Urology 1999;53:302-307
89. Morrison AS. Advances in the etiology of urothelial cancer. Urol.Clin.North Am. 1984;11:557-566
90. Morrison AS, Buring JE, Verhoek WG, Aoki K, Leck I, Ohno Y, Obata K. An international study of smoking and bladder cancer. J.Urol. 1984;131:650-654

91. Murakami S, Igarashi T, Hara S, Shimazaki J. Strategies for asymptomatic microscopic hematuria: a prospective study of 1,034 patients. *J.Urol.* 1990;144:99-101
92. Ozen H. Bladder cancer. *Curr.Opin.Oncol.* 1998;10:273-278
93. Palit V, Phillips RM, Puri R, Shah T, Bibby MC. Expression of HIF-1alpha and Glut-1 in human bladder cancer. *Oncol.Rep.* 2005;14:909-913
94. Pauwels RP, Schapers RF, Smeets AW, Debruyne FM, Geraedts JP. Grading in superficial bladder cancer. (1). Morphological criteria. *Br.J.Urol.* 1988;61:129-134
95. Perabo FG, Muller SC. Current and new strategies in immunotherapy for superficial bladder cancer. *Urology* 2004;64:409-421
96. Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *J.Biol.Chem.* 2005;280:22473-22481
97. Philp EA, Stephenson TJ, Reed MW. Prognostic significance of angiogenesis in transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. *Br.J Urol* 1996;77:352-357
98. Pitard A, Brennan P, Clavel J, Greiser E, Lopez-Abente G, Chang-Claude J, Wahrendorf J, Serra C, Kogevinas M, Boffetta P. Cigar, pipe, and cigarette smoking and bladder cancer risk in European men. *Cancer Causes Control* 2001;12:551-556
99. Pore N, Jiang Z, Gupta A, Cerniglia G, Kao GD, Maity A. EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms. *Cancer Res.* 2006;66:3197-3204

100. Raj GV, Herr H, Serio AM, Donat SM, Bochner BH, Vickers AJ, Dalbagni G. Treatment paradigm shift may improve survival of patients with high risk superficial bladder cancer. *J.Urol.* 2007;177:1283-1286
101. Ravery V, Colombel M, Popov Z, Bastuji S, Patard JJ, Bellot J, Abbou CC, Fradet Y, Chopin DK. Prognostic value of epidermal growth factor-receptor, T138 and T43 expression in bladder cancer. *Br.J.Cancer* 1995;71:196-200
102. Rehn L. Über Blasentumoren bei Fuchsinarbeitern. 1895;50:588-595
103. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674
104. Roberts N, Kloos B, Cassella M, Podgrabinska S, Persaud K, Wu Y, Pytowski B, Skobe M. Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res.* 2006;66:2650-2657
105. Rocchetti R, Talevi S, Margiotta C, Calza R, Corallini A, Possati L. Antiangiogenic drugs for chemotherapy of bladder tumours. *Chemotherapy* 2005;51:291-299
106. Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP. Schistosomiasis. *N.Engl.J.Med.* 2002;346:1212-1220
107. Rübber H. *Uroonkologie.* 2007;4:303-304
108. Rübber H, Otto T. *Harnblasenkarzinom.* 1993;79-147
109. Rudat V, Stadler P, Becker A, Vanselow B, Dietz A, Wannemacher M, Molls M, Dunst J, Feldmann HJ. Predictive value of the tumor oxygenation by means of pO<sub>2</sub> histography in patients with advanced head and neck cancer. *Strahlenther.Onkol.* 2001;177:462-468
110. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998;17:3005-3015
111. Sanchez-Carbayo M, Cordon-Cardo C. Molecular alterations associated with bladder cancer progression. *Semin.Oncol.* 2007;34:75-84

112. Schellhammer PF, Kaplan MH, Pinsky CM, Whitmore WF, Jr. Study of local and systemic effects of intravesical BCG. *Urology* 1975;6:562-567
113. Schmidbauer J, Witjes F, Schmeller N, Donat R, Susani M, Marberger M. Improved detection of urothelial carcinoma in situ with hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy. *J Urol* 2004;171:135-138
114. Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K. *Kompendium Internistische Onkologie*. 1997;2:1332-1374
115. Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* 2000;35:71-103
116. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer* 2003;3:721-732
117. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-845
118. Sinclair AM, Todd MD, Forsythe K, Knox SJ, Elliott S, Begley CG. Expression and function of erythropoietin receptors in tumors: implications for the use of erythropoiesis-stimulating agents in cancer patients. *Cancer* 2007;110:477-488
119. Smith JA, Jr., Labasky RF, Cockett AT, Fracchia JA, Montie JE, Rowland RG. Bladder cancer clinical guidelines panel summary report on the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1 and TIS). The American Urological Association. *J Urol* 1999;162:1697-1701
120. Sobin DH, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 2002;6:199-202
121. Soloway MS, Lee CT, Steinberg GD, Ghandi AA, Jewett MA. Difficult decisions in urologic oncology: Management of high-grade T1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol.* 2007;25:338-340

122. Sonpavde G, Jian W, Liu H, Wu MF, Shen SS, Lerner SP. Sunitinib malate is active against human urothelial carcinoma and enhances the activity of cisplatin in a preclinical model. *Urol.Oncol.* 2009;27:391-399
123. Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JA, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* 1998;160:645-659
124. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner DG. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J.Clin.Oncol.* 2001;19:666-675
125. Sternberg CN, de MP, Schornagel JH, Theodore C, Fossa SD, van Oosterom AT, Witjes JA, Spina M, van Groeningen CJ, Duclos B, Roberts JT, de BC, Collette L. Seven year update of an EORTC phase III trial of high-dose intensity M-VAC chemotherapy and G-CSF versus classic M-VAC in advanced urothelial tract tumours. *Eur.J.Cancer* 2006;42:50-54
126. Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watson RC, Ahmed T, Weiselberg LR, Geller N, Hollander PS, Herr HW, Sogani PC, . Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium. *J.Urol.* 1985;133:403-407
127. Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watson RC, Geller N, Herr HW, Morse MJ, Sogani PC, Vaughan ED, Bander N. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. Efficacy and patterns of response and relapse. *Cancer* 1989;64:2448-2458
128. Stuben G, Thews O, Pottgen C, Knuhmann K, Vaupel P, Stuschke M. Recombinant human erythropoietin increases the radiosensitivity of xenografted human tumours in anaemic nude mice. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 2001;127:346-350

129. Suttman H, Lehmann J, Stöckle M. Adjuvante und Neoadjuvante Chemotherapie beim Harnblasenkarzinom. Was ist gesichert? *Onkologe A* 2007;12:1101-1108
130. Theodoropoulos VE, Lazaris AC, Kastriotis I, Spiliadi C, Theodoropoulos GE, Tsoukala V, Patsouris E, Sofras F. Evaluation of hypoxia-inducible factor 1alpha overexpression as a predictor of tumour recurrence and progression in superficial urothelial bladder carcinoma. *BJU.Int.* 2005;95:425-431
131. Thews O, Koenig R, Kelleher DK, Kutzner J, Vaupel P. Enhanced radiosensitivity in experimental tumours following erythropoietin treatment of chemotherapy-induced anaemia. *Br.J.Cancer* 1998;78:752-756
132. Tinker A, Winqvist E, Canil C, Moore M, Murray RN, Chi KN. A phase I dose finding study of cisplatin, gemcitabine, and weekly docetaxel for patients with advanced transitional cell cancer. *Am.J.Clin.Oncol.* 2006;29:3-7
133. Tosoni I, Wagner U, Sauter G, Egloff M, Knonagel H, Alund G, Bannwart F, Mihatsch MJ, Gasser TC, Maurer R. Clinical significance of interobserver differences in the staging and grading of superficial bladder cancer. *BJU.Int.* 2000;85:48-53
134. Toyoshima K, Ito N, Hiasa Y, Kamamoto Y, Makiura S. Tissue culture of urinary bladder tumor induced in a rat by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine: establishment of cell line, Nara Bladder Tumor II. *J.Natl.Cancer Inst.* 1971;47:979-985
135. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist.* 2004;9 Suppl 5:4-9
136. Vaupel P, Mayer A, Hockel M. Impact of hemoglobin levels on tumor oxygenation: the higher, the better? *Strahlenther.Onkol.* 2006;182:63-71
137. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM, Kerbrat P, Sanchez RP, Wersall P, Cleall SP, Roychowdhury DF, Tomlin I, Visseren-Grul CM, Conte PF. Gemcitabine

- and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J.Clin.Oncol.* 2000;18:3068-3077
138. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Zimmermann A, Arning M. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:4602-4608
139. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:5510-5514
140. Weiss C, Sauer R, Rodel C. Radiochemotherapeutic options for bladder cancer. *Aktuelle Urol.* 2008;39:123-129
141. Wetterauer U, Rutishauser G, Sommerkamp H. *Urologie.* 1995;214-223
142. Wolter P, Grünwald V, Beutel G, Schöffski P. Konventionelle und experimentelle Systemtherapie des fortgeschrittenen Urothelkarzinoms. *Onkologe A* 2007;12:1109-1120
143. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-248
144. Yang J, Wu HF, Qian LX, Zhang W, Hua LX, Yu ML, Wang Z, Xu ZQ, Sui YG, Wang XR. Increased expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-C and VEGF receptor-3 in prostate cancer tissue are associated with tumor progression. *Asian J.Androl* 2006;8:169-175
145. Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, Park JW. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl.Cancer Inst.* 2003;95:516-525
146. Yosry A. Schistosomiasis and neoplasia. *Contrib.Microbiol.* 2006;13:81-100

147. Zeegers MP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. A prospective study on active and environmental tobacco smoking and bladder cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control* 2002;13:83-90

## 7. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben:

- meiner Familie für grenzlose Liebe und das Vertrauen
- Frau Dr. med. Julia Fechner für ihre Menschlichkeit
- Herr Dr. med. Guido Fechner für seine Geduld, grenzlose Hilfe und kompetente Betreuung der Arbeit
- Doris Schmidt für ihre Kreativität, ständige Hilfe und Begeisterung
- Prof. Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller für die Überlassung des Themas
- Dr. rer. nat. Dipl. -Phys. S. Garbe für die Bestrahlung der Tiere