

In-vitro, in-vivo und klinische Untersuchungen zur Wirksamkeit des Angiogeneesehemmers Thalidomid

Habilitationsschrift

Zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Julian W. Mall

geboren am 29. August 1967 in Homburg/Saar

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Eingereicht: Januar/2003,

Habilitation am 13.11.03

Gutachter:

1. Professor Dr. med. JM Müller
2. Professor Dr. med. H-D. Saeger
3. Professor Dr. med. H. Ostertag

„Aufgrund meiner klinischen und histologischen Beobachtungen stelle ich fest, daß bösartige Tumore häufig durch eine deutlich erhöhte peritumoröse Gefäßvaskularisierung gekennzeichnet sind. Eine große Bedeutung haben Endothelzellen, die in der Lage sind Tumorzellen und Zellen des Immunsystems miteinander kommunizieren zu lassen.“

E. Metchnikoff (russ. Arzt und Physiologe, Nobelpreisträger 1908) {234}



Kaninchenkorneamodell zur Untersuchung der Angiogenese: Zentral eine avaskuläre Zone nach Einbringen des Angiogenesehemmers Thalidomid {D Ámato et al.; 130}.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Angioneogenese	5
1.2. Prognostische Bedeutung der Angioneogenese bei Karzinomen	8
1.3. Angioneogeneseinhibitoren	12
1.4. Thalidomid	15
1.5. Thalidomid und Karzinomtherapie	19
1.6. Unerwünschte Wirkungen von Thalidomid	23
2. Ziele der Arbeit	25
2.1. Rationale für eine antiangiogenetische Therapie mit Thalidomid	25
2.1.1. Prospektiv randomisierte Placebo kontrollierte Doppel-blind Studie zur Verlängerung der Überlebenszeit durch die additive Gabe von Thalidomid zur Kombinationschemotherapie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom	27
2.1.2. In vitro Untersuchungen zur Proliferationshemmung von Kaninchenendothelzellen durch Thalidomid	28
2.1.3. Untersuchungen der Wirkung von intraperitoneal appliziertem Thalidomid nach Kolonresektion im Kaninchentiermodell	29
2.1.4. Hypothesen der Monographie	31
3. Prospektiv randomisierte Placebo-kontrollierte Studie zur Verlängerung der Überlebenszeit durch die additive Gabe von Thalidomid zur Kombinationschemotherapie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom	32
3.1. Art der Studie	32
3.2. Zielkriterien	32
3.2.1. Stadieneinteilung	33
3.2.2. Therapie	34
3.2.3. Prognose	36
3.3. Material und Methoden	38
3.3.1. Studienablauf	40
3.3.2. Ein / Ausschlusskriterien der Studie	41
3.3.3. Untersuchung von TNF $-\alpha$, VEGF, NSE, Albumin und LDH	42
3.3.4. Stichprobenumfang	43
3.4. Ergebnisse	44
3.4.1. Krankengut	44
3.4.2. Vergleichbarkeit der untersuchten Gruppen	44
3.4.3. Analyse des Hauptzielkriteriums Überlebenszeit	45
3.4.4. Nebenzielkriterien	48
3.4.5. Nebenwirkungen der Chemoherapie mit ACO 1 und additiver Thalidomidgabe	52

3.5.	Diskussion	55
4.	In-vitro Versuche zur Hemmung der Proliferation von Kaninchenendothelzellen durch Thalidomid	63
4.1.	Material und Methoden	64
4.2.	Ergebnisse	68
4.3.	Diskussion	74
5.	Grundlagen der Anastomosenheilung	77
6.	Randomisierte Studie zur Untersuchung des Einfluß von i.p. appliziertem Thalidomid auf die Heilung von Kolonanastomosen im Kaninchentiermodell	
6.1.	Material und Methoden	82
6.1.1.	Operationsablauf	82
6.1.2.	Dosierung von Thalidomid	83
6.1.3.	Untersuchung des Berstungsdrucks	85
6.1.4.	Immunhistochemische Aufarbeitung der Anastomosenpräparate	87
6.2.	Ergebnisse	89
6.2.1.	Gewicht	89
6.2.2.	Berstungsdruckmessung	90
6.2.3.	Angioneogenesescor (AS)	92
6.2.4.	Mib-1 (VAS)	94
6.2.5.	Untersuchung der Leukozytenkonzentration im peripheren Blut	95
6.2.6.	Untersuchung des Hämoglobingehalts	96
6.2.7.	Thrombozyten	97
6.2.8.	Adhäsionscore	98
6.2.9.	TNF alpha Konzentration im Serum	100
6.3.	Diskussion	101
7.	Gesamtdiskussion	104
8.	Zusammenfassung	118
9.	Schlußfolgerung	120
10.	Ausblick	121
	Danksagung	123
	Literaturverzeichnis	125
	Eidesstattliche Versicherung	143

1. Einleitung

1.1. Angiogeneese

Bereits im Jahr 1972 berichtete die Arbeitsgruppe um den Bostoner Kinderchirurgen Judah Folkman über die Tatsache, daß die Neovaskularisation von Tumoren eine essentielle Voraussetzung für deren Wachstum und Metastasierung darstellt {1}. Es gilt als gesichert, daß Karzinomzellverbände nur bis zu einer Größe von ca. 2-3 mm³ durch Diffusion ernährt werden können. Zu einem weiteren Wachstum und zur hämatogenen sowie lymphogenen Metastasierung benötigen die Tumorzellen Anschluß an das Wirtsgefäßsystem. Dieses Phänomen wird als Tumorneoangiogenese bezeichnet und konnte in verschiedenen experimentellen Modellen eindeutig nachgewiesen werden. Das bekannteste Modell ist das durch Folkman et al. etablierte Kaninchenkornea-Modell {1,2}. Hierbei ist nach der Implantation von Tumorzellen in die avaskuläre Kornea des Kaninchens zunächst ein Wachstum der Zellen bis zu einer Größe von ca 3 mm³ zu beobachten. Danach tritt ein Wachstumsstillstand ein. Erst nach dem Einsprossen von Gefäßen aus der Peripherie der Kornea erfolgt eine weitere Größenzunahme des Tumors. Weitere Modelle zur Angiogeneeseuntersuchung stellen das Hühnerei-Chorionallantois-Modell sowie die Boydenkammer dar, auf die jedoch hier nicht weiter eingegangen werden soll . In der Weiterentwicklung des Kaninchenkornea-Modells konnten Brem sowie Holmgren und Mitarbeiter in Untersuchungen zeigen, daß ohne adäquate Gefäßversorgung eine Nekrose der Tumorzellen eintritt oder die Zellen in die Apoptose übergehen {3,4}.

Die Neoangiogenese beginnt zunächst mit der Aktivierung von bereits vorhandenen Endothelzellen durch Zellmitogene, die häufig auch als Zytokine bezeichnet werden. Durch verschiedene Arbeitsgruppen wurden in den letzten Jahren mehrere dieser

Substanzen identifiziert, unter anderem VEGF (Vasculo endothelialer growth factor) TGF α (Transforming growth factor α), PDGF (Platelet derived growth factor) oder bFGF (Basic fibroblast growth factor) {5,6,7}. Die zytokininduzierte Initiierung der Angiogenese wird über die Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie vermittelt. Dies führt zu einer Erhöhung der Permeabilität der Kapillaren und damit zum Austreten von Plasmaproteinen. Die Endothelzellen beginnen sich unter der Einwirkung von sezernierten Zellmitogenen zu teilen und proteolytische Enzyme, sogenannte Matrixmetalloproteasen (MMP) zu produzieren. Nach Degradation der Basalmembran der Gefäße reagieren die Endothelzellen mit Proliferation und Migration und letztendlich der Ausbildung primitiver tubulärer Strukturen die sich in weiteren Schritten zu Kapillaren umformen. Schließlich kommt es zur Ausbildung neuer, mit dem Tumor in Kontakt stehender Gefäße. Ein entscheidender Schritt in der Neoangiogenese ist die Aktivierung der Endothelzellen durch Mitogene. Physiologischerweise befinden sich die Endothelzellen in einem unter Umständen jahrelang währenden Ruhezustand, der erst durch die Aktivierung durch Zellmitogene aufgehoben wird. Die wichtigsten Mitogene scheinen der vascular endothelial growth factor (VEGF) {5,6,7} und der basic fibroblast growth factor (bFGF) {8,9,10} zu sein. Mittlerweile sind vier transmembranöse Rezeptortypen auf Endothelzellen für VEGF (1-4) sowie für bFGF (1-4) identifiziert worden, die alle der Tyrosinkinase-Rezeptorfamilie zugeordnet werden können und über die eine Signaltransduktionskaskade im Inneren der Endothelzellen gesteuert werden kann {11,12,13,14,15}. Darüberhinaus sind seither noch mehr als 15 Mitogene oder Substanzen bekannt geworden, die die Proliferationseigenschaften und Funktionen der Endothelzellen beeinflussen können (Tabelle 1).

Mediatoren der Angiogenese
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) A-D
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)
Acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF)
Angiogenin
Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor (PD-ECGF)
Epidermal Growth Factor (EGF)
Scatter Factor (SF)
Placental Growth Factor (PIGF)
Interleukin-8 (IL-8)
Tumor-Necrosis-Factor- α (TNF- α)
Angiopoetin 1 und 2
Transforming Growth Factor- α (TGF- α)
Transforming Growth Factor- α (TGF- β)

Tabelle 1: Mediatoren der Angiogenese

Die Produktion der Mitogene erfolgt häufig konstitutiv durch die Tumorzellen selber, kann aber auch durch Veränderung der physiologischen Bedingungen (Hypoxie, Wundheilung, Diabetes mellitus) bedingt sein {16}. Aber auch die Ausschüttung von Zytokinen durch inflammatorische Zellen, die durch das Tumorwachstum aktiviert werden, spielt eine Rolle. Hier sind insbesondere das TNF-alpha sowie das Interleukin IL-1 beta zu nennen, die u.a. auch die VEGF Produktion fördern {13,14,16}.

1.2. Prognostische Bedeutung der Angiogenese bei Karzinomen

Seit die Arbeitsgruppe um Noel Weidner et al. 1991 erstmals über den Angiogeneseegrad als einen unabhängigen prognostischen Faktor beim invasiven Mammakarzinom berichtete, haben mehrere Arbeitsgruppen an verschiedenen Karzinomen in den letzten Jahren eine erhöhte Angiogeneseaktivität im Vergleich zu normalem Gewebe bewiesen {17}.

Saclarides et al. fanden eine Korrelation zwischen Gefäßdichte und Tumorstadium beim kolorektalen Karzinom ebenso wie Macchianini et al. beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom {18,19}. Gleiches gilt für mehrere zerebrale Karzinome im Kindesalter, Blasenkarzinome, Melanome sowie invasiv wachsende Prostatakarzinome {20,21}. In eigenen Untersuchungen konnte bei 70 Patienten mit Plattenepithel- und Adenokarzinomen des Ösophagus eine Korrelation fortgeschrittener Tumorstadien mit einem erhöhten Angiogenesecore, sowie einer erhöhten VEGF Produktion immunhistochemisch in den Tumorpräparaten nachgewiesen werden {22}.

Die Neoangiogenese, die auch bei physiologischen Prozessen wie der Wundheilung, Schwangerschaft, altersbedingter Makuladegeneration und dem Menstruationszyklus eine wichtige Rolle spielt, unterliegt strengen körpereigenen Regulationsmechanismen {8,10,11,16}. Neben den in Tabelle 1 erwähnten Stimulatoren der Neoangiogenese existieren diverse endogene Inhibitoren der Neoangiogenese in vivo. Hierbei handelt es sich überwiegend um proteolytische Spaltprodukte größerer Proteine, die selbst keine antiangiogenetische Aktivität besitzen. Teilweise sind diese Vorläuferproteine Komponenten der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagen XVIII oder Thrombospondin, oder gehören zum Gerinnungssystem wie das Antithrombin III oder Plasminogen. Einen Überblick über einige bekannte endogene Angiogeneseinhibitoren verschafft Tabelle 2.

Endogene Angiogeneseinhibitoren	Vorläuferproteine
Endostatin	Kollagen XVIII
Angiostatin	Plasminogen
Vasostatin	Calretikulin
Restin	Kollagen XV
Thrombospondinfragmente	Thrombospondin
Fragment von PF4	Plättchenfaktor 4
Antithrombinfragment	Antithrombin
Prolaktinderivat	Prolaktin
Osteopontinfragment	Osteopontin
Interferon $\alpha\beta$	Unbekanntes Vorläuferprotein

Tabelle 2: Vorläuferproteine und endogene Inhibitoren der Angiogenese

Entscheidend für den Beginn der Neoangiogenese ist wahrscheinlich das Auftreten eines Ungleichgewichtes zwischen endogenen Inhibitoren und Stimulatoren der Angiogenese {8-20}. Dieser „angiogenic switch“ genannte Prozeß kann durch von Tumorzellen sezernierte Zytokine, aber auch durch andere pathophysiologische Mechanismen (Hypoxie, Wundheilung, Diabetes mellitus, altersbedingte Makuladegeneration) ausgelöst werden. In vitro läßt sich die normalerweise bestehende Balance zwischen Angiogenesepromotern und Inhibitoren sehr gut demonstrieren. In Proliferationsassays können die Angiogenesepromoter VEGF und bFGF eine Proliferation von kultivierten Endothelzellen hervorrufen. Die Proliferation kann durch Hinzugabe des endogenen Angiogeneseinhibitors Thrombospondin-1 (TSP-1) geblockt werden {23,24}. Dies geschieht dosisabhängig und ist reversibel, wenn die

Konzentration der Promoter wieder erhöht wird. Weitere Untersuchungen an verschiedenen humanen Tumorzellen, die durch einen Verlust des Tumorsuppressorgens p53 gekennzeichnet sind, zeigen eine Überproduktion von bFGF. Wird durch Gentransfer das p53 Gen wieder funktionsfähig, so resultiert dies in einer erhöhten Thrombospondin-1 Produktion, die konsekutiv zu einer Downregulation der bFGF Produktion und damit der Blockade des angiogeneischen Stimulus führt {24}.

Eine entscheidende Rolle in der Regulation der Angiogenese kommt den Endothelzellen zu. Bereits vor mehr als 100 Jahren wurde 1883 die Bedeutung von Endothelzellen bei der Ausbildung von Entzündungsreaktionen und peritumorösen Gewebereaktionen durch den russischen Arzt und Physiologen Elias Metchnikoff beschrieben {25}. Verbesserte Untersuchungstechniken sowie ein gestiegenes Interesse nicht zuletzt im Zuge der Angiogeneseforschung haben jedoch erst in den letzten Jahrzehnten zu einer intensiveren Erforschung der Funktionen der Endothelzellen geführt. Endothelzellen zählen zu den langlebigsten Zellen des menschlichen Organismus mit Ausnahme der Zellen des zentralen Nervensystems. In einem normalen, adulten, humanen Gefäß befindet sich zu einem beliebigen Untersuchungszeitpunkt lediglich 1 von 10.000 Endothelzellen (0,01%) in der Zellteilungsphase {26,27}. Im Vergleich hierzu befinden sich etwa 14% der normalen intestinalen epithelialen Zellen im Zellteilungszyklus. Dies bedeutet, daß der Zellumbau von Darmschleimhaut in Tagen, derjenige von Endothelzellen jedoch in Jahren gemessen wird. Kommt es jedoch zu einem adäquaten Stimulus kann die Proliferations- und Teilungsrate erheblich gesteigert werden. Die Zellen formen eine Monolayerschicht in Gefäßen und haben neben der bereits angedeuteten Regulation der Angiogenese

eine zentrale Bedeutung in der Regulation vieler physiologischer und pathophysiologischer Reaktionen des Organismus. Obwohl initial die Bedeutung der Endothelzellen hauptsächlich als passive Barriere gegenüber dem Gefäßlumen und dem Interstitium gesehen wurde ist heute jedoch klar, daß diese Zellen mit Hilfe multipler Protein- und Enzymreaktionen einen differenzierten Beitrag zu verschiedensten komplexen Abläufen im Organismus leisten. So sind sie an der Regulation der Gerinnung sowohl inhibitorisch als auch fördernd beteiligt. Durch die Sekretion des Plättchen aktivierenden Faktors und die Synthese des von Willebrandt Antigens bei Gefäßverletzungen wird eine Plättchenaggregation durch die Endothelzelle initiiert und gesteuert. Entzündungsreaktionen, Verletzungen und Zytokinstimulation z. B. durch TNF- α können die normalerweise antikoagulatorisch ausgerichteten Funktionen der Endothelzelle in prokoagulatorische Aktivitäten verändern. So kann es dann zur Expression von Tissue Factor (TF) auf der Oberfläche von Endothelzellen kommen, die als Bindungsstelle für Faktor VII fungiert, der durch die Bindung aktiviert wird. Der aktivierte Komplex aus TF und Faktor VII kann Faktor X über mehrere Wege aktivieren und so in die Koagulationskaskade regulatorisch eingreifen. Desweiteren sind Endothelzellen an der Regulation des Vasomotorischen Tonus über die Synthese von mindestens drei verschiedenen Vasodilatoren (Prostazyklin, Endothelgenerierter Relaxierender Faktor, Endothelgenerierter hyperpolarisierender Faktor) beteiligt. Auch Vasokonstriktoren werden durch die Endothelzelle synthetisiert. Unter anderen wurde der derzeit stärkste physiologisch vorkommende Vasokonstriktor, das Endothelin, als Syntheseprodukt der Endothelzelle identifiziert.

1.3. Angiogeneinhibitoren

In den letzten 10 Jahren sind potentielle Hemmer der Angiogenese zunehmend Gegenstand intensiver klinischer Forschung geworden. Ziel dieser Therapie ist es, das Wachstum und die Metastasierung eines Primärtumors zu verhindern bzw. Mikrometastasen, die noch keinen Anschluß an das Wirtsgefäßsystem gefunden haben, in einem sogenannten "Schlafzustand" zu halten. Dies könnte bedeuten, daß das Auftreten eines Rezidivs nach kurativer Resektion eines Karzinoms respektive das Auftreten von metachronen Metastasen durch die dauerhafte Gabe eines Angiogenesehemmers verhindert wird. Antiangiogenetische Substanzen setzen an unterschiedlichen Punkten der Angiogenese an {28}. Während Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren (Marimastat®, Neovastat®) den Abbau von extrazellulärer Matrix durch erythrozytäre Proteasen hemmen {29}, behindern andere Substanzen u.a. auch die Migration der Endothelzellen durch die Hemmung von Zell-Zell-Interaktionen und Zytokininteraktionen (Thalidomid®, TNP 470®) {30,31}. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Inhibition angiogenetischer Wachstumsfaktoren {32,33,34}. Darüberhinaus kommen Rezeptorantagonisten verschiedener pro-angiogenetischer Faktoren wie z.B. des VEGF (SU5416) {35}, von VEGF und PDGF (Leflunomid) {36,37,38,39} oder Antikörper gegen VEGF in klinischen Studien zur Anwendung. Derzeit werden mehrere Angiogenesehemmer mit unterschiedlichen Ansatzpunkten in klinischen Prüfungen untersucht (Tabelle 3).

Ein Wirkstoff bei dem gute in-vitro und in-vivo Erkenntnisse über die antiangiogenetischen Eigenschaften nach eigenen Untersuchungen vorliegen ist das ursprünglich als Immunsuppressivum entwickelte Leflunomid (Arava®). Dieses Medikament ist in Deutschland seit 1999 zur Therapie der rheumatoiden Arthritis

zugelassen. Biochemisch sind bislang zwei Wirkungsmechanismen von LEF bekannt. Nach Metabolisierung in der Darmschleimhaut und der Leber in den aktiven Metaboliten A771726 hemmt es zum einen die Neusynthese von Pyrimidinen über eine reversible Hemmung des Schlüsselenzyms der Pyrimidinsynthese, der Dihydroorotatsynthetase. Zum anderen inhibiert es die Tyrosinkinaseaktivität von Wachstumsfaktorrezeptoren wie dem PDGF-Rezeptor {36} und dem VEGF-1-Rezeptor {37}. In eigenen in vitro und in vivo Versuchen konnte die Proliferationshemmung durch LEF und seinen aktiven Metaboliten A771726 an Plattenepithelkarzinomzellen und Gliomzellen unabhängig von der Hemmung der Pyrimidinnukleotidsynthese nachgewiesen werden {36,37}. Der Angiogenesescore in subkutan implantierten Kolonkarzinomzellverbänden im Mausmodell wird durch die orale Gabe von Leflunomid wirksam reduziert {39}.

Eine Hemmung der Gefäßneubildung könnte auf einer Inhibition von endothelialen Rezeptor-Tyrosinkinasen für angiogenetische Wachstumsfaktoren wie PDGF {38} und VEGF {37} beruhen. Zusätzlich wurde im Nacktmausmodell die Wachstumshemmung subkutan implantierter Kolonkarzinomzellen sowie die Reduktion des Angiogenesecores durch die orale Gabe von Leflunomid nachgewiesen {39}. Darüberhinaus fanden Vlassenko und Mitarbeiter in einer prospektiven Phase II Studie nach radiologischen Kriterien signifikant bessere Tumorremissionen bei Patienten mit Rezidivtumoren eines malignen Glioblastoms {40}.

Inhibitoren für Endothelzellen			
Thalidomid	Grünenthal	Phase 3	SCLC
Thalidomid	Celgene	Phase 2	Non-SCLC
Combretastatin	Oxigene	Phase 1	Versch. Karzinome
Endostatin	Entremed	Phase 1	Versch. Karzinome
Rezeptorantagonisten pro-angiogenetischen Faktoren			
Leflunomid (VEGF,PDGF)	Hoechst		Heilversuche
SU5416 (VEGF)	Sugen	Phase 3	Kolonkarzinom
SU6668 (VEGF, PDGF, FGF)	Sugen	Phase 1	Versch. Karzinome
Matrixmetalloproteinase-inhibitoren			
AG3340	Agouron	Phase 3	Bronchial-ProstataCa
Neovastat	Aeterna	Phase 3	NierencellCa
COL 3	Collagenex	Phase 1	Versch. Karzinome
BMS-275291	Bristol-Myers Squibb	Phase 1	Versch. Karzinome
Marimastat	British Biotech	Phase 3	Bronchial-MammaCa
Integrinantagonist			
EMD 121974	Merck	Phase 2	Pankreaskarzinom

Tabelle 3: Einsatz unterschiedlicher Angiogeneseinhibitoren in klinischen Studien

Eine weitere Substanz, die bereits seit mehr als 40 Jahren auf dem Weltmarkt ist und in den letzten 10-15 Jahren ein erneutes Interesse als Angiogenesehemmer erfahren hat ist das Medikament Thalidomid.

1.4. Thalidomid

Thalidomid wurde ursprünglich als Sedativum erstmals 1954 durch den deutschen Chemiker H. Kunz synthetisiert (Grünenthal AG, Aachen, Deutschland) {41}. Bis zur Entdeckung der teratogenen Wirkung der Substanz und der Herausnahme des Medikamentes aus dem deutschen Markt im November 1961 wurde Thalidomid in einer hohen Quantität in Deutschland hergestellt und verkauft {41,42}. Biochemisch handelt es sich bei Thalidomid um ein 2-(2,6-Dioxo-Piperidine-3-yl)-Iso-Indol-1,3-Dion. Thalidomid racemisiert in Vollblut mit einer Halbwertszeit von 2,25 h in ein rechts- und ein linksdrehendes Enantiomer {42}. Die Ausscheidung erfolgt zu etwa gleichen Teilen über die Niere und die Leber {43}. Die Substanz zeichnet sich durch eine gute Verträglichkeit nach oraler Einnahme sowie eine ausgezeichnete Bioverfügbarkeit aus {41,42,43}.

Die vielfältigen Wirkungen von Thalidomid sind trotz mehr als dreissig veröffentlichter Hypothesen über den Wirkungsmechanismus des Medikaments nicht vollständig geklärt {51,52}. Das gestiegene Interesse der Wissenschaft führte durch intensive Forschung zu Erkenntnissen über immunomodulatorische, antiangiogene und anti-inflammatorische Eigenschaften des Medikaments (Tabelle 4). Das Zytokin Tumornekrose-Faktor α (TNF- α) wirkt immunomodulatorisch, induziert Fieber, spielt eine wichtige Rolle im septischen Schock, wird für die Tumorkachexie verantwortlich gemacht, wirkt zytolytisch auf Tumorzellen und besitzt angiogenetische Wirkung. TNF- α induziert die Bildung von VEGF, einem der wichtigsten Zytokine in der Ausbildung neuer Gefäße. Die wichtigste TNF- α Quelle stellen aktivierte Makrophagen dar, es wird jedoch auch von anderen Zellen, insbesondere Lymphozyten und Mastzellen, gebildet. Thalidomid beschleunigt den Abbau der TNF- α mRNA und verhindert so die TNF- α -Sekretion durch aktivierte

Makrophagen {53}. Rowland et al. (1998) konnten in vitro zeigen, daß Thalidomid selektiv die Bildung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 6 und TNF- α durch humane Monozyten hemmt, ohne die Proliferation oder die Sekretion von Interleukin 2, Interleukin 4 oder Interleukin 10 zu beeinflussen {54}. Tavares et al. (1997) fanden eine Hemmung der TNF- α Produktion bei Alveolarmakrophagen von Patienten mit Tuberkulose, Sarkoidose, Bronchialkarzinom, chronischer Bronchitis und Pneumonie durch Thalidomid {55}. Moreira et al. (1997) untersuchten die Wirkung von Thalidomid in einem Tuberkulose Modell bei Mäusen. Die behandelten Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion des TNF- α Spiegels und damit einhergehend geringer ausgeprägte pathologische Veränderungen der Lunge, ohne daß es zu einem Anstieg der Erregerzahl kam {56}. Bei Lepra-Patienten wird Thalidomid zur Behandlung des durch exzessive Bildung von TNF- α ausgelösten Erythema nodosum leprosum eingesetzt {57}.

- Inhibierung der Chemotaxis von Leukozyten {58}
- Veränderung der TNF- α induzierten Dichte von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten {59}
- Verminderte Phagozytoseaktivität von Polymorphkernigen Granulozyten {60}
- Erhöhte Produktion von IL-4 und IL-5 durch mononukleäre Zellen {61}
- Inhibierung der Interferon- γ Produktion durch mononukleäre Zellen {61}
- Inhibierung der Interleukin-12 Produktion {62}
- Inhibierung der TNF- α Produktion durch Monocyten und Makrophagen durch Reduktion der Halbwertszeit der m-RNA des TNF- α {63,64}

Tabelle 4: Immunomodulatorische und anti-inflammatorische Wirkungen von Thalidomid.

Die reduzierte Phagozytoseaktivität durch polymorphkernige Granulozyten ist eine mögliche Erklärung für die beobachtete anti-inflammatorische Wirkung von Thalidomid bei einigen Krankheitsbildern, bei denen der Entzündungsprozess vornehmlich über eine Akkumulation von mononukleären Zellen gesteuert wird, wie z.B. beim chronischen kutanen Lupus Erythematodes {60}. Die Inhibierung der Phagozytoseaktivität der Monozyten oder Granulozyten durch das Medikament wird nicht auf zytotoxischer Basis vermittelt {60}.

Thalidomid inhibiert selektiv die Produktion von TNF- α bei humanen Monozyten {63,64}. Diese dosisabhängige Wirkung betrifft nicht die gesamte Proteinsynthese oder die gesamte TNF- α Produktion {63,65}. Thalidomid reduziert die Halbwertszeit der TNF- α mRNA von ca. 30 Minuten auf ca. 17 Minuten {64}. Betrachtet man die zentrale Rolle, die TNF- α in der Regulation der inflammatorischen Antwort des Organismus auf eine Infektion besitzt, so können verschiedenste klinische Effekte durch die Downregulation von TNF- α durch Thalidomid angenommen werden {65}. So ist z.B. die kutane Manifestationsform der Lepraerkrankung (Erythema nodosum leprosum) mit erhöhten TNF- α Spiegel in assoziiert, die durch die Einnahme von Thalidomid gesenkt werden können {66,67,68}. Eine Senkung des TNF- α Spiegels geht mit einer modifizierten Hautreaktion sowie einer veränderten histologischen Zusammensetzung des charakteristischen Leukozyteninfiltrats in den lepromatösen Hautveränderungen einher {68}.

Die Veränderung des TNF- α Spiegels durch Thalidomid ist in verschiedenen Studien durch Jacobson et al. sowie Wolkenstein et al. angezweifelt worden {69,70}. In Untersuchungen dieser Arbeitsgruppen kam es unter Einnahme von Thalidomid bei HIV Patienten mit AIDS Erkrankung {69} sowie toxischer epidermaler Nekrolyse {70} sogar

zu einer Erhöhung der Serum TNF- α Spiegels. Diese Untersuchungsergebnisse könnten in der Tatsache begründet sein, dass die TNF- α Produktion vom zellulären Stimulus und dem Ort der TNF- α Produktion abhängig ist {48}. Zusätzlich ist derzeit unklar, wie normale TNF- α Spiegel bei unterschiedlichen Erkrankungen im Serum definiert sind, und ob die Sekretion des Zytokins nicht in Phasen abläuft, deren Minimum und Maximum nicht bekannt sind. Daher könnten unterschiedliche Messwerte auch durch unterschiedliche Messzeitpunkte bedingt sein {48,69,71}. Es existieren zwei verschiedene aktive Formen von TNF- α : Einerseits die membrangebundene Form sowie andererseits eine zirkulierende Homotrimer Form (71,72). Typischerweise wird in den meisten Untersuchungen nur die zirkulierende TNF- α Form gemessen {72}. Messungen des TNF- α erfassen demnach häufig nur die detektierbare rezeptorbindungsfähige zirkulierende Form, die unter Umständen gar nicht die aktive TNF- α Form darstellt. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß einige Wirkungen des Medikaments geklärt sind, jedoch bei weitem nicht alle. Insbesondere die immunmodulatorischen Eigenschaften von Thalidomid sind derzeit intensiver Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Jedoch wird über klinische Erfolge beim Einsatz des Medikaments in den letzten Jahren insbesondere bei Karzinompatienten berichtet.

1.5. Thalidomid und Karzinomtherapie

In den letzten 10 Jahren ist die Wirkung von Thalidomid als Angiogenesehemmer in-vitro, in-vivo sowie in verschiedenen klinischen Studien untersucht worden.

In-vitro Studien

Dixon und Mitarbeiter beobachteten nach Inkubation von Thalidomid mit humanen androgenabhängigen Prostatakarzinomzellen (LNCaP) eine Zunahme der PSA-Konzentration und eine zytostatische Wirkung, wohingegen bei androgenunabhängigen Prostatakarzinomzellen (PC-3) ein zytostatischer Effekt durch Thalidomid nicht nachweisbar war {73}. In einer weiteren Studie an humanen Mammaadenokarzinomzellen sah Nguyen eine signifikante Beeinflussung des Tumorzellwachstums durch Thalidomid alleine und in Kombination mit Chemotherapeutika im Vergleich zu Kontrollgruppen {74}. Da das Zytokin TNF- α in der Angiogenese als Promoter von proangiogenetischen Faktoren (b-FGF, VEGF) sowie bei der Immunmodulation verschiedenster Zytokine eine bedeutende Funktion einnimmt, wurde auch die Wirkung von Thalidomid in-vitro auf die TNF- α Produktion untersucht. Dabei fanden Sampaio und Mitarbeiter eine selektive Inhibition der TNF- α Produktion von Makrophagen durch Thalidomid {63}. Ähnliche Beobachtungen machten Wnendt und Mitarbeiter, jedoch war die Hemmung der TNF- α Produktion abhängig von der Enantiomerkonfiguration des Thalidomid {75}. Auch Neubert sah in einer in-vitro Studie an humanen Monozyten eine deutliche Reduktion der TNF- α Freisetzung nach Ko-inkubation mit Thalidomid {76}. Weitere Untersuchungen von Mc Hugh und Mitarbeiter sowie Gardner-Medwin kamen zu vergleichbaren in-vitro Ergebnissen {77,61}.

Tiermodelle

Nach Gabe von Thalidomid berichten Swartz et al. über eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums im B16-BL6 Melanom Maus-Modell {78}. Ebenfalls am Maus-Modell mit Mammaadenokarzinomzellen zeigten Nguyen et al. eine signifikante Reduktion der Tumorgröße nach Gabe von Thalidomid in Kombination mit Adriamycin und Zytosan im Vergleich zur alleinigen Gabe der beiden Chemotherapeutika {79}. Andererseits sahen Gutman et al. im Tierversuch bei B16-Melanomzellen und bei CT-26-Kolonkarzinomzellen keinen signifikanten Unterschied im Tumorzellwachstum nach Thalidomidgabe {80}. Kotoh und Mitarbeiter konnten bei intraperitonealer Gabe von Thalidomid bei subkutan implantierten Ösophaguskarzinomen (ES 63) im Nacktmausmodell eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums und des Angiogenesekores feststellen. Dieser Effekt ließ sich bei oraler Gabe des Medikaments jedoch nicht nachweisen {81}. In einem weiteren Tiermodell an Nacktmäusen der Reihen C3H/hen und C57/b16 beobachteten Minchington et al. nach intraperitonealer Gabe keine Inhibition des Tumorwachstums sakral induzierter Tumore mit Zellen aus Lewis Lung Tumoren und anaplastischen Plattenepithelkarzinomen {82}. In einer weiteren Tierstudie an New Zealand White Kaninchen sahen Verheul und Mitarbeiter eine signifikante Reduktion des Wachstums von in der Leiste injizierten Plattenepithelkarzinomzellen nach oraler Thalidomidtherapie.

Ein potenziertes Effekt wurde durch die gleichzeitige Gabe des Medikaments mit Sulindac®, einem oralen Antiphlogistikum gesehen. Gleichzeitig war in der immunhistochemischen Untersuchung der Tumorpräparate ein signifikant niedriger Angiogenesekore nachweisbar, sodaß die Reduktion des Tumorwachstums nach Schlußfolgerung der Arbeitsgruppe auf die Angiogeneseinhibition zurückgeführt wurde {83}.

Klinische Studien

Derzeit werden in den USA unter Mitwirkung der Firma Celgene® und des National Cancer Institutes (NCI) drei von der FDA geförderte Phase II-Studien bei Patienten mit Mamma- und Prostatakarzinomen sowie Glioblastompatienten durchgeführt.

Aufgrund der derzeit noch zu niedrigen rekrutierten Patientenzahlen kann über die Wirksamkeit von Thalidomid in der additiven Therapie bei diesen Tumoren noch keine Aussage getroffen werden. Jedoch existieren andere klinische Studien, bei denen eine Wirksamkeit der Thalidomid-Therapie nachgewiesen werden konnte. So sahen Singhal et al. bei 89 Patienten mit high risk refractory Myelomen bei 20% der Patienten einen Rückgang des Serum M-Protein-Wertes und in 60% der Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung unter Therapie mit Thalidomid {84}. Barlogie et al. berichten über 10 Patienten mit high risk refractory Myelomen, bei denen eine alleinige Chemotherapie oder alleinige Thalidomid Therapie nicht wirksam war, jedoch die Kombination aus beiden Agenzien zu einer Remission der Erkrankung führte {85}.

Desweiteren fanden Politi und Mitarbeiter in einer Phase I-Studie an AIDS-Patienten mit Kaposi-Sarkomen eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten nach der Gabe von Thalidomid {86}. In einer Phase-II-Studie berichteten Bower et al. nach Thalidomidgabe ebenfalls über eine verlängerte Überlebenszeit bei

Medikament	Hersteller	Studientyp	Tumorentität	Studienleiter
Thalidomid®	Grünenthal®	Phase 3	Kleinzell. BroCa	(Mall et al.)
Thalidomid®	Celgene®	Phase 2	Nicht-Kleinzell. BroCa	(NIH.)
Thalidomid®	Celgene®	Phase 1	Kaposisarkom	(Politi et al.)
Thalidomid®	Grünenthal®	Phase 2	ProstataCa	(Figg et al.)
Thalidomid®	Celgene®	Phase 2	Glioblastom	(Fine et al.)
Thalidomid®	Celgene®	Phase 2	Astrozytom	(Fine et al.)
Thalidomid®	Celgene®	Phase 3	Mult. Myelome	(Singhal et al)
Thalidomid®	Celgene®	Phase 2	Kaposisarkom	(Bower et al.)

Tabelle 5: Klinische Studien zur Untersuchung der Verlängerung der Überlebenszeit bei unterschiedlichen Karzinomen nach additiver Thalidomidgabe.

Patienten mit Kaposi-Sarkomen {87}. Weitere Phase-II-Studien von Fine et al. zur additiven Gabe von Thalidomid in der Behandlung des Astrocytoms und des High grade Glioblastoms zeigten bei 50% der behandelten Patienten einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber der Plazebogruppe {88}.

Nach den oben zitierten Untersuchungen kann es als gesichert gelten, daß der additive Einsatz von Thalidomid beim therapierefraktären Multiplen Myelom zu einer signifikanten Verbesserung der Prognose der Patienten führt. Zu dieser Indikation ist Thalidomid im Rahmen des sogenannten STEPS-Programm (**S**ystem for **T**halidomide **E**ducation and **P**rescribing **S**afety) der FDA in den USA zugelassen {89}.

1.6. Unerwünschte Wirkungen von Thalidomid

Die teratogenen Effekte von Thalidomid begründeten den hohen Bekanntheitsgrad des Medikaments in den 60er Jahren {44,45}. Unter diesen teratogenen Effekten ist vor allem die Phokomelie und Dysmelie der Extremitäten zu nennen. Jedoch wurde im Zusammenhang mit der Einnahme von Thalidomid während der Schwangerschaft auch über das Auftreten von Duodenalatresien, Ösophagusfisteln, Neuralrohrdeformationen, Mikroophthalmie, Ohrmissbildungen sowie Mittellinienhämangiomen berichtet {46,47}. Die Angaben über das Auftreten einer peripheren Neuropathie unter Thalidomidtherapie variieren in der Literatur zwischen 1-70% {47,48}. Das klinische Erscheinungsbild äussert sich in symmetrischen, schmerzhaften Parästhesien der Hände und Füße, häufig begleitet von Sensibilitätsverlusten in den Oberschenkeln der Patienten {47,48,49}. In einer Studie an 42 Patienten fanden Ochonski und Mitarbeiter keine Korrelation zwischen dem Auftreten einer peripheren Neuropathie unter Thalidomidtherapie und der Dosis oder der Länge der Therapie {49}. Es zeigte sich jedoch, dass Frauen und ältere Patienten (>70 Jahre) signifikant häufiger betroffen waren. Ein Problem in der Beurteilung der durch Thalidomid hervorgerufenen peripheren Neuropathie ergibt sich jedoch aus der Tatsache, dass die meisten Daten aus retrospektiven Analysen eines sehr inhomogenen Krankenguts stammen. Häufig wurden Krankheiten untersucht, die selber eine periphere Neuropathie hervorrufen können (Lepra, AIDS), oder Thalidomid wurde mit neuropathisch wirksamen Medikamenten verabreicht (Zytostatika), so dass eine genaue Analyse dieser Nebenwirkung noch aussteht. Zusätzlich variieren die Untersuchungstechniken von lediglich klinischer Einschätzung und Patientenangaben bis hin zu regelmässig durchgeführten Nervenleitgeschwindigkeitsmessungen und intensivem

neurophysiologischem Monitoring (50).

Weitere auftretende Nebenwirkungen sind bei 10-30 Prozent der untersuchten Patienten Obstipation, die jedoch meist durch die Gabe milder Laxantien zu kurieren ist, sowie in 2-10 Prozent das passagere Auftreten einer Hautrötung (Flush).

2. Ziele der Arbeit

2.1. Rationale für eine antiangiogenetische Therapie mit Thalidomid

Die dargelegten Studienergebnisse aus der Literatur über eine antiangiogenetische und zytokinmodulatorische Wirkung von Thalidomid in der Therapie maligner Tumore waren der Anlaß für die Planung und Gestaltung der hier vorgestellten Arbeit. Die selektive Inhibition der TNF- α Produktion durch Thalidomid läßt Thalidomid als ideales Medikament für Krankheitszustände erscheinen, bei denen die TNF- α Toxizität eine pathogenetische Rolle spielt, die Immunität jedoch intakt bleiben muß. Zu diesen Krankheitszuständen zählen auch Tumorleiden, da hier das TNF- α eine entscheidende Rolle für den allgemeinen Verfall in fortgeschrittenen Krankheitsstadien spielt, eine Immunsuppression jedoch mit einem beschleunigten Fortschreiten der Erkrankung einhergehen würde. Sollte über die verringerte TNF- α Bildung die VEGF-Produktion von Karzinomzellen oder aussprossenden Endothelzellen verringert werden, könnte dadurch die Angiogenese bei Karzinomen gehemmt, und so die Rezidiv- respektive Metastasenentwicklung verzögert und eventuell gänzlich verhindert werden. Ein weiterer möglicher Mechanismus, der die Grundlage einer antiangiogenetischen Wirksamkeit von Thalidomid begründet, ist die von Neubert et al. und Friedlander et al. beschriebene Downregulation der $\alpha\beta$ -3 Integrine auf der Oberfläche von Endothelzellen durch Thalidomid, die zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit der Endothelzellen und damit zur Hemmung einer Neubildung von neuen Gefäßen führen könnte.

Zunächst sollte die klinische Prüfung von Thalidomid bei einer Karzinomerkkrankung mit einer sehr schlechten Prognose erfolgen. Wenn sich hierbei zeigt, daß das Medikament in der palliativen Situation einen positiven Einfluß auf den Verlauf der Erkrankung hat,

könnte der additive Einsatz des Angiogenesehemmers auch bei Karzinomen gerechtfertigt sein, für die etablierte chirurgische Therapieformen vorliegen. Vor dem perioperativen Einsatz von Thalidomid bei der chirurgischen Resektion gastrointestinaler Karzinome muß jedoch unbedingt sichergestellt sein, daß die Therapie mit Thalidomid nicht zu einer erhöhten postoperativen Morbidität und Letalität führt. Deshalb müssen tierexperimentelle Untersuchungen dem klinischen Einsatz des Medikaments bei der chirurgischen Therapie vorangehen. Um sicherzustellen, daß diese Untersuchungen auch in einem geeigneten Tiermodell durchgeführt werden ist eine in-vitro Überprüfung des angenommenen Effekts von Thalidomid bei Endothelzellen des untersuchten Tiers notwendig. Darüberhinaus sollten im Tiermodell auch andere potentielle Effekte des Medikaments wie z. B. die Reduktion von Verwachsungen aufgrund einer TNF-alpha Hemmung und einer Makrophageninhibition oder die Veränderung von gerinnungsaktiven Substanzen untersucht werden. Auf der Grundlage dieser Überlegungen wurden deshalb in der dargelegten Monographie folgende klinische, in-vitro und in vivo Untersuchungen durchgeführt:

2.1.1. Prospektiv randomisierte Placebo kontrollierte Doppel-blind Studie zur Verlängerung der Überlebenszeit durch die additive Gabe von Thalidomid zur Kombinationschemotherapie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom

Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist eine Karzinomerkkrankung mit einer ausgesprochen schlechten Prognose. Eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 6-10 Monaten ist unabhängig von der gewählten Therapie trotz aller Versuche der Therapieoptimierung der letzten zwei Jahrzehnte nicht gelungen. Langzeitüberlebende (> 5 Jahre) stellen immer noch eine Rarität dar. Auf der Grundlage des in der Einleitung dargelegten Standes der Angiogeneseforschung könnte der Einsatz von Thalidomid in der Behandlung von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom additiv zur etablierten Chemotherapie zu einer Verlängerung der Überlebenszeiten führen.

In einer prospektiven, randomisierten, doppel-blind Studie an 70 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom (Small Cell Lung Cancer – SCLC) wurde die Beeinflussung der Überlebenszeit durch die additive Therapie mit Thalidomid in Kombination mit einer Standardpolychemotherapie und Strahlentherapie untersucht. Aufgrund der äußerst schlechten Prognose des SCLC wurde diese Tumorentität als geeignetes Krankengut für die Untersuchung der Wirksamkeit von Thalidomid ausgewählt. Hauptzielkriterium der Studie war die Überlebenszeit der eingeschlossenen Patienten. Nebenzielkriterien war die Erfassung der Korrelation der Surrogatparameter Albumin, LDH, NSE und des Zytokins VEGF mit dem Tumorstadium der erkrankten Patienten. Die Nachbeobachtungszeit der Patienten betrug mindestens 2 Jahre.

H₀ = Die Gabe von Thalidomid verändert die Überlebenszeit von Patienten mit der Diagnose kleinzelliges Bronchialkarzinom nicht.

H_{Alternativ} = Die Gabe von Thalidomid verändert die Überlebenszeit von Patienten mit der Diagnose kleinzelliges Bronchialkarzinom.

2.1.2. In vitro Untersuchungen zur Proliferationshemmung von Kaninchenendothelzellen durch Thalidomid

Vor der Etablierung eines Kaninchentiermodells wurde in-vitro der Nachweis einer direkten antiangiogenetischen Wirkung von Thalidomid auf Kaninchenendothelzellen untersucht. Hierzu wurde durch New Zealand White Kaninchen metabolisiertes Thalidomid mit Kaninchenendothelzellen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und die Wirkung auf die Endothelzellproliferation untersucht.

H₀ = Die Gabe von durch NZW Kaninchen metabolisiertem Thalidomid verändert die Proliferationsrate von Kaninchenendothelzellen nicht.

H_{Alternativ} = Die Gabe von durch NZW Kaninchen metabolisiertem Thalidomid verändert die Proliferationsrate von Kaninchenendothelzellen.

2.1.3 Untersuchungen der Wirkung von intraperitoneal appliziertem Thalidomid nach Kolonresektion im Kaninchentiermodell

Der klinische Einsatz eines Antiangiogenesehemmers könnte für Patienten mit soliden Karzinomen nach der chirurgischen Karzinomresektion von Vorteil sein. Wenn nach R0 – Resektion eines gastrointestinalen Karzinoms durch die Gabe von Thalidomid ein erneutes Anwachsen von okkulten Metastasen verhindert werden könnte, würde dieses einen bedeutenden Fortschritt in der chirurgischen Therapie dieser Patienten bedeuten. Idealerweise sollte die antiangiogenetische Therapie bereits perioperativ einsetzen, um zum frühestmöglichen Zeitpunkt eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration von Thalidomid im Organismus zu erzielen und einen unmittelbaren Beginn der antiangiogenetischen Wirkung zu ermöglichen. Vor dem perioperativen Einsatz von Thalidomid bei der Resektion gastrointestinaler Karzinome muß jedoch unabdingbar die Frage geklärt werden, ob diese Therapie keinen negativen Einfluß auf das zu erwartende Operationsergebnis hat. Hendriks und Mitarbeiter fanden in einer tierexperimentellen Studie an Ratten nach Kolonresektionen eine signifikant höhere Rate an Anastomoseninsuffizienzen mit Ausbildung einer bakteriellen Peritonitis nach intraperitonealer Gabe des Angiogenesehemmers Suramin am 7. postoperativen Tag {167}. Da diese schwerwiegende Komplikation ein nicht zu tolerierendes Risiko in der Standardtherapie von Patienten mit einem Kolonkarzinom darstellt, muß vor dem Einsatz von Thalidomid gesichert sein, daß die intraperitoneale Gabe eines Angiogenesehemmers nach Anlage einer Kolonanastomose nicht zu einer höheren Rate an Insuffizienzen mit nachfolgender Peritonitis führt. Daher wurde im tierexperimentellen Teil der Arbeit der Einfluß von intraperitoneal appliziertem Thalidomid auf die Heilung von Kolonanastomosen im Kaninchentiermodell überprüft.

Hauptzielkriterium war der Berstungsdruck der Anastomosen am 3. und 7. postoperativen Tag. Nebenzielkriterien waren der TNF- α Spiegel im Serum, der immunhistochemisch ermittelte Angiogenesescore, die Entzündungsreaktion des Organismus gemessen an der Leukozytenpopulation sowie eine Beeinflussung der Thrombozytenzahl durch Thalidomid.

H₀ = Die intraperitoneale Gabe von Thalidomid verändert den Berstungsdruck von Kolonanastomosen im Kaninchenmodell nicht.

H_{Alternativ} = Die intraperitoneale Gabe von Thalidomid verändert den Berstungsdruck von Kolonanastomosen im Kaninchenmodell.

Da in der Literatur hinreichend Belege für eine Korrelation des TNF- α Spiegels sowie der Veränderung der Adhäsionsfähigkeit sowohl von Endothelzellen als auch bei Makrophagen mit der Ausbildung von intraabdominalen Adhäsionen nach chirurgischen Eingriffen vorliegen, wurde die Ausprägung intraperitonealer Adhäsionen nach Kolonresektionen nach intraperitonealer Thalidomidgabe untersucht. Hierzu wurde vor respektive nach einer Zökumresektion im Kaninchenmodell die Ausprägung der Verwachsungen anhand eines Verwachsungsscores bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Entnahme von Peritonealbiopsien zur Messung des Gehalts an Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) sowie Tissue-Plasminogen-Aktivator (tPA) zur Bestimmung der Beeinflussung dieser wichtigen Faktoren für die intraperitoneale Verwachsungsbildung durch die intraperitoneale Applikation von Thalidomid.

H₀ = Die intraperitoneale Gabe von Thalidomid verändert die Ausbildung von Adhäsionen nach Kolonanastomosen im Kaninchenmodell nicht.

H_{Alternativ} = Die intraperitoneale Gabe von Thalidomid verändert die Ausbildung von Adhäsionen nach Kolonanastomosen im Kaninchenmodell.

2.1.4. Hypothesen der Monographie

Die Gabe des Angiogenesehemmers Thalidomid führt

1. additiv zu einer Standardpolychemotherapie bei Patienten mit SCLC zu einer Verlängerung der Überlebenszeit,
2. in-vitro nach Metabolisierung zu einer Hemmung der Proliferation von Kaninchenendothelzellen,
3. nach Anlage einer Kolonanastomose im Kaninchentiermodell nicht zu negativen Folgen für die Heilung der Anastomose,
4. zu einer verminderten Ausprägung von Adhäsionen nach Zökumresektion im Kaninchentiermodell

3. Prospektiv randomisierte Placebo-kontrollierte Studie zur Verlängerung der Überlebenszeit durch die additive Gabe von Thalidomid zur Kombinationschemotherapie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom

3.1. Art der Studie

In der hier vorgestellten Studie wurde prospektiv randomisiert, Placebo kontrolliert in einer Doppel-blind Studie der Effekt einer additiven Therapie mit dem Angiogenesehemmer Thalidomid zusätzlich zur Standardkombinationschemotherapie an 70 Patienten mit histologisch gesichertem kleinzelligem Bronchialkarzinom untersucht. Somit handelt es sich bei dieser Untersuchung um eine Phase IIIa Studie zur Überlebensverlängerung durch Thalidomid bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom. Es existieren keine prospektiv randomisierten Studien zum Einfluß von Thalidomid auf die Überlebenszeit von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom. Sollte die additive Therapie mit Thalidomid einen positiven Einfluß auf die Überlebenszeit bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom haben, könnten ca. 12-14.000 Patienten jährlich von einer derartigen Therapie profitieren.

3.2. Zielkriterien

Hauptzielkriterium war die Überlebenszeit der Patienten. Als ein signifikanter Überlebensvorteil wurde eine Verlängerung der Überlebenszeit um 1,5 Monate (45 Tage) angenommen.

Nebenzielkriterien waren die Korrelation der etablierten Surrogatparameter beim kleinzelligen Bronchialkarzinom Albumin, LDH, NSE sowie des angiogenetischen

Zytokins VEGF mit dem Tumorstadium der Erkrankung. Darüberhinaus wurden auftretende Nebenwirkungen unter der additiven Therapie mit Thalidomid untersucht.

Das kleinzellige Bronchialkarzinom repräsentiert ca. $\frac{1}{4}$ aller jährlich in Deutschland neu diagnostizierten Bronchialkarzinome. Mit einer Inzidenz von 16/100000 pro Jahr treten ca. 12.000-14.000 Neuerkrankungen in der Bundesrepublik auf {109,110}. In den USA wird die Zahl der Neuerkrankungen mit ca 45.000 Patienten/Jahr im Jahr 2000 angegeben {112}. Die Erkrankung ist charakterisiert durch schnelles Tumorwachstum, frühzeitige Generalisierung, ausgezeichnetes Ansprechen auf Chemo- oder Strahlentherapie, aber ebenso ausgesprochen hohe Rezidivraten und damit schlechte Langzeitergebnisse. Hauptrisikofaktor der Erkrankung ist der Nikotinabusus. Weitere bekannte exogene Noxen stellen Asbest, Radon, Chrom, Nickel, Beryllium und aromatische Kohlenwasserstoffe dar {109,116,119}.

3.2.1. Stadieneinteilung

Zur Stadieneinteilung der Erkrankung ist in Deutschland neben der UICC (TNM-System) Klassifikation die von Wolf und Havemann et al. {109,110,116} geprägte sogenannte Marburger Klassifikation gebräuchlich (Tabelle 6). Hierbei wird zwischen den Stadien „Very limited disease“, „Limited Disease“ und „Extensive disease (I, II, III)“ unterschieden (Tabelle x). Die früher häufig genutzte Klassifikation der Veterans Administration Lung Cancer Group (VALG) ist heute weitgehend verlassen worden {118}. Etwa $\frac{1}{3}$ aller Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom befindet sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Stadium „limited disease“ (ohne Fernmetastasen) während bereits bei $\frac{2}{3}$ der Patienten eine metastasierte Erkrankung im Stadium „extensive disease“ vorliegt {113,114,118,119}.

Stadium	Klinisches Erscheinungsbild
Very Limited Disease (VLD)	Primärtumor von Lungengewebe oder viszeraler Pleura umgeben mit maximal partieller Atelektase; kleiner Winkelerguß ohne maligne Zellen; Lymphknotenbefall hilär ipsilateral
Limited Disease“ (LD)	Primärtumor mit Thoraxwand-, mediastinaler Pleura-, oder Diaphragmainfiltration; Totalatelektase einer Lunge; Lymphknotenbefall mediastinal ipsi- oder kontralateral sowie kontralateral hilär
Extensive disease (ED I)	entspricht einem Primärtumor mit Herz-, Ösophagus- oder Wirbelsäuleninfiltration; maligner Perikarderguß; maligner Pleuraerguß; Rekurrens-, Phrenikusparese; Vena Cava Superior Syndrom; Lymphknotenbefall supraclavikulär ipsi- oder kontralateral.
Extensive disease (ED II)	hämatogene Fernmetastasen in einem Organ einschließlich kontralateralem Lungenbefall
Extensive disease (ED III)	hämatogene Fernmetastasen in mehr als einem Organ

Tabelle 6: Marburger Klassifikation des kleinzelligen Bronchialkarzinom nach Wolf und Havemann.

3.2.2. Therapie

Aufgrund der raschen und frühzeitigen Metastasierung sind alleinige lokale Maßnahmen wie Operation und/oder Strahlentherapie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom im allgemeinen kontraindiziert {110-117}. Lediglich in ausgewählten Fällen oder im Rahmen von kontrollierten Studien kommt die primäre chirurgische Tumorresektion in Kombination mit Radio/Chemotherapie zur Anwendung {120}. Aufgrund der hohen Proliferationsrate (Tumorverdoppelungszeit 10-50 Tage), der frühzeitigen lymphogenen und hämatogenen Disseminationstendenz sowie der hohen Sensibilität gegenüber der Chemotherapie steht dieses Therapiekonzept an erster Stelle der Behandlungsmodalitäten des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. In der Literatur werden für mehr als 10 Substanzen Remissionsraten von wenigstens 20 % berichtet {113,114,117}. Zu diesen zählen unter anderem Adriamycin, Cisplatin, Cyclophosphamid, Etoposid, Vincristin sowie Vindesin. Jedoch ist die Remissionsrate die mit den Einzelsubstanzen erzielt werden kann sehr vom Tumorstadium abhängig. Da mit der Monotherapie nur selten eine Vollremission, die alleine eine Chance auf ein

längeres krankheitsfreies Überleben bietet, erzielt wird, ist bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten eine Kombinationschemotherapie indiziert {111,112,116}. Lediglich bei multimorbiden Patienten, bei denen eine kombinierte Chemotherapie nicht durchgeführt werden kann, ist eine Monotherapie indiziert. Ein gängiges Schema, welches sich durch relativ gute Verträglichkeit für den Patienten auszeichnet, ist das ACO 1-Schema (Adriamycin, Cyclophosphamid, Oncovin) nach Livingston und Seeber {118, 119}. Hierbei erfolgt die Gabe von 6 Zyklen der Zytostatika

Adriamycin	60 mg/m ² iv. am 1. Tag
Cyclophosphamid	750 mg/m ² iv. am 1. Tag
Oncovin	< 2 mg iv. Tag 1., 8., 15. Tag.

Eine Wiederholung des Zyklus erfolgt im dreiwöchigen Rhythmus. Dieses Schema wird insbesondere bei Patienten im Stadium „extensive disease“ angewendet, oder wenn größere Toxizitäten vermieden werden sollen. Bei Patienten mit einer auf den Thorax begrenzten Erkrankung (VLD und LD Stadium) ist zusätzlich eine adjuvante Bestrahlung des Thorax indiziert.

Weitere gängige Schemata sind das ACE-Schema, das ACO 2-Schema sowie die EpiCO Therapie nach Drings {115,116}. Neue Therapiekonzepte unter Einbeziehung von weiterentwickelten Chemotherapeutika wie zB. Gemcitabine, Matrixmetalloproteinasen oder Taxanen konnten bisher keine eindeutige Verbesserung der Prognose der Erkrankung herbeiführen {120,121,122,123}.

3.2.3. Prognose

Trotz aller Bemühungen in der Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist eine durchgreifende Besserung der Behandlungsergebnisse in den letzten Jahrzehnten nicht erreicht worden. Während bei Patienten ohne Fernmetastasen eine Langzeitüberlebensrate von 5-10 % beobachtet wird, stellt das Überleben von 5 Jahren bei Patienten mit metastasierter Erkrankung eine Rarität dar {99,100,111,120}. Die prognostische Bedeutung des Stadiums der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung unterstreicht eine Analyse an 2580 Patienten der South Western Oncology Group aus dem Jahr 1990 {112}. Hier betrug die mediane Überlebenszeit bei Patienten im Stadium „Limited und Very Limited Disease“ 386 Tage gegenüber einer medianen Überlebenszeit von nur 164 Tagen bei Patienten im Stadium „Extensive Disease II a und b“. Spiegelmann et al. berichten im Stadium „Extensive Disease“ über einen hochsignifikanten Einfluß der Lokalisation sowie der Ausdehnung der Metastasen auf die Überlebenszeit und die Remissionsraten {113}. Bei alleinigem Pleurabefall wurden Remissionsraten von 60%, bei Metastasen an mehr als zwei unterschiedlichen Lokalisationen von nur noch 41% beobachtet. Die mediane Überlebenszeit (mÜLZ) fiel von 341 Tagen bei alleinigem Pleurabefall auf 193 Tage bei Metastasen an 2 Lokalisationen, und auf 168 Tage bei Metastasen an 3 Lokalisationen ab.

Die Art der Therapie hat nach Manegold einen signifikanten Einfluß auf die Prognose {115}. Ohne Therapie beträgt die mÜLZ lediglich 58 Tage, mit Chemotherapie 148 Tage und bei Strahlen- und Chemotherapie 303 Tage. Bei diesen Angaben ist jedoch zu beachten, daß die hier angegebenen Zahlen nicht alleine die Effektivität der Therapieart wiedergeben, sondern auch durch die unterschiedlichen Stadien und andere Prognosekriterien mit beeinflußt werden {116}. Trotz der intensiven Chemotherapie ist

die lokoregionäre Rezidivneigung des kleinzelligen Bronchialkarzinomes hoch. 50-80 % der Patienten erleiden nach alleiniger Chemotherapie ein intrathorakales Rezidiv. Diese Rate kann durch zusätzliche Strahlentherapie auf unter 30 % gesenkt werden {117,118}. Bei alleiniger Strahlentherapie liegen die lokalen Kontrollraten im Stadium IIa und IIb zwischen 20 bis maximal 40 %. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt in nahezu allen Analysen unter 5 % {100,109,116,119,120}. Der Einsatz neuerer Chemotherapeutika in der Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms wie zB. Gemcitabin und Paclitaxel sowie von Matrixmetalloproteinaseinhibitoren scheint eine Verlängerung der krankheitsfreien Zeit sowie der Überlebenszeit zu bewirken, jedoch liegen definitive Studienergebnisse mit einer ausreichenden Anzahl untersuchter Patienten sowie einem hohen Evidenzgrad derzeit nicht vor {120-123}. Auch über den Stellenwert einer chirurgischen Therapie in Kombination mit einer neoadjuvanten Therapie, der von einigen Arbeitsgruppen untersucht wird, liegen noch keine definitiven Studienergebnisse vor. In der vorliegenden Studie sollte an 70 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom der additive Effekt des Angiogenesehemmers Thalidomid auf die Überlebenszeit überprüft werden.

3.3. Material und Methoden

Die Untersuchung der Patienten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Pneumologie und Allergologie des städtischen Krankenhauses Heidehaus Hannover, (Städtischen Krankenhauses Heidehaus, Am Leineufer 70, 30419 Hannover, Chefarzt: Dr. med. W. Mall). In der pneumologischen Klinik werden jährlich ca. 50 Patienten mit der Diagnose kleinzelliges Bronchialkarzinom behandelt.

Nach positivem Votum der Ethikkommission der Charité zum vorgelegten Studienprotokoll wurde die Studie am 01. August 1999 begonnen. Jeder Patient mit einem kleinzelligen Bronchialkarzinom der in der pneumologischen Klinik des städtischen Krankenhauses Heidehaus Hannover stationär aufgenommen wurde, wurde in einem für diese Untersuchung erstellten Dokumentationsbuch erfasst und dokumentiert. Der Umfang und die Art und Weise der Standardtherapie des Karzinoms wurden durch die Studie nicht beeinflusst. Im Anschluß an die stationäre Diagnostik und der -soweit nicht bereits auswärts erfolgten- histologischen Sicherung des Karzinoms wurden die Patienten bei fehlenden Ausschlußkriterien in die Studie eingeschlossen und randomisiert (Studienleitung in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Campus Mitte, in Berlin, Dr. med. J. Mall). Jeder Patient wurde vor Therapiebeginn mit Thalidomid auf das Vorliegen einer peripheren Neuropathie untersucht. Bei Patientinnen erfolgte in jedem Fall vor Verabreichung von Thalidomid die Durchführung eines Schwangerschaftstests.

Nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten erfolgte in der Verum-Gruppe die Gabe von Thalidomid zusätzlich zur Gabe des ACO 1-Schemas einmal täglich abends in einer Dosierung von 2 x 100 mg per os beginnend am Abend vor

Beginn der Standardkombinationschemotherapie (Bereitstellung der Medikation durch die Firma Grünenthal AG, Aachen; Dr. med. K. Zwingenberger). Patienten, die sich im Stadium very limited disease oder limited disease befanden, wurden zusätzlich zur genannten medikamentösen Therapie mit 45 Gy thorakal bestrahlt.

Die Dosierung der Studienmedikation Thalidomid ist in den meisten Studien unterschiedlich und variiert von 100 mg/d bis hin zu 800 mg/d bei Patienten mit multiplem Myelom. Ericsson und Mitarbeiter sowie Wnendt und Mitarbeiter konnten jedoch zeigen, daß ausreichende Blut/Plasmaspiegel zur TNF- α -Hemmung bei einer Dosierung von 200 mg/d erreicht werden {41,42,124}. Da zum Zeitpunkt der Planung der Studie keine gesicherten Erkenntnisse über eine bessere antiangiogene Wirksamkeit in der Tumorthherapie bei einer höheren Dosierung von Thalidomid vorlagen, wurde in der vorliegenden Studie 200 mg/d als Dosierung angewendet.

Die Nachuntersuchungen erfolgten im ersten Jahr in dreimonatigen Abständen. Bestandteil der Nachsorge waren jeweils ein komplettes Labor mit Prognoseparametern und Tumormarkern (CEA, NSE, Albumin, LDH), Zytokinuntersuchung (TNF- α , VEGF, IL-6 und IL-12), Röntgen-Thoraxuntersuchung in 2 Ebenen, Sonographie des Thorax und Abdomens, Lungenfunktionsanalyse im Bodyplethysmograph mit kapillärer Blutgasanalyse sowie halbjährlich CT-Thorax und Bronchoskopie. Zusätzlich erfolgte alle drei Monate die Erfassung der Lebensqualität der Patienten mit Hilfe des Lebensqualitätsbogens der EORTC mit Zusatzmodul Bronchialkarzinom (QLQ30). Die Nachsorgeergebnisse wurden im Nachsorgedokumentationsbogen prospektiv erfasst und als Durchschlag in das Studienzentrum nach Berlin gesandt. Dort erfolgte die Eingabe der Daten durch den Studienleiter (Dr. med. J.W. Mall) und dessen Stellvertreter (Dr. med. C. Pollmann) in eine relationale Datenbank (Paradox für DOS 3.5) und Auswertung mit dem Statistical Analysis System (SAS for Windows⁹⁸, Version 6.08).

3.3.2. Ein- und Ausschlußkriterien der Studie

Einschlußkriterien: Alle Patienten mit einem gesicherten kleinzelligen Bronchialkarzinom mit einem Risikoprofil der ASA-Klasse I-III wurden in die Studie aufgenommen.

Als Ausschlußkriterien galten:

Gravidität
Ausgeprägte bestehende periphere Polyneuropathie
Medikamenten-, Alkoholabhängigkeit
Ileus
manifeste Obstruktion der Atemwege mit poststenotischer Pneumonie und/oder Atelektase
massiver Pleuraerguß (> 1L)
Thrombozytopenie < 40000, - Leukozytopenie < 3000
ASA-Klasse V
Vorbehandlung des Karzinoms in einer anderen Klinik

Tabelle 7: Ausschlußkriterien für die additive Gabe von Thalidomid bei kleinzelligem BroCa.

Unerwünschte Ereignisse während der Studie.

Zu jedem Patienten erhielt die betreuende Doktorandin einen verschlossenen Umschlag mit der Entblindung und einem Dokumentationsbogen zur Erfassung des aufgetretenen Ereignisses. Dieser konnte bei aufgetretenem unerwünschten Ereignis Grad 3 oder 4 nach Rücksprache mit dem Studienleiter geöffnet werden. Die unerwünschten Effekte wurden entsprechend der WHO Klassifikation in mild (Grad 1), moderat (Grad 2), schwerwiegend (Grad 3), schwerste Nebenwirkung einschließlich Exitus (Grad 4) unterteilt und dokumentiert.

3.3.3. Untersuchung von TNF - α , VEGF, NSE, Albumin und LDH

Den Patienten wurden vor Therapiebeginn sowie anlässlich der ersten dreimonatigen Kontrolluntersuchung zur Quantifizierung von TNF- α , VEGF, NSE, Albumin und LDH im Rahmen der Routineblutentnahme 10 ml Blut in Serumröhrchen entnommen. Nach Zentrifugation bei 3000 U/min erfolgte das Abpipettieren des Überstandes und die Lagerung bei -70° Celsius bis zur endgültigen Analyse. Nach Transport unter optimalen Tiefkühlbedingungen wurde die Bestimmung der Zytokine mittels Elisa-Technik in Zusammenarbeit mit der Firma Grünenthal AG Aachen, Deutschland (Dr. med. Kai Zwingenberger) in Aachen durchgeführt. Für die Analyse der genannten Zytokine stehen kommerzielle Test-Kits der Firma R&D Systems Wiesbaden, Deutschland zur Verfügung. Die verwendeten Methoden zur Bestimmung der immunologischen Parameter sind fest etabliert. Eine Neuentwicklung dieser Methoden war daher zur Durchführung der Untersuchungen nicht erforderlich.

Vor Therapiebeginn erfolgte die Untersuchung der Serumspiegel von TNF-alpha, NSE und VEGF durch Elisa Bestimmung (R&D Systems Wiesbaden, Germany and Bioscentia GMBH, Hamburg Germany). Albumin und LDH wurden durch photomorphometrische Analyse im Routinelabor des Städtischen Krankenhaus Heidehaus bestimmt. Auch diese Methoden sind fest etablierte Bestandteile der Untersuchungsmethoden des Städtischen Krankenhaus Heidehaus und mussten deshalb nicht neu etabliert werden.

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe einer relationalen Datenbank SAS Windows98®, Microsoft Access Datenbank. Die Assoziation zwischen Tumorstadium und VEGF, NSE, LDH und Albumin wurde durch Waller Duncan k ratio t-test untersucht. Korrelationen zwischen VEGF, NSE, LDH und Albumin wurden mit Pearson's Korrelationstest analysiert.

3.3.4. Stichprobenumfang

Zum Zeitpunkt der Studienplanung lagen keine Literaturdaten zur Verlängerung der Überlebenszeit bei der additiven Behandlung kleinzelliger Bronchialkarzinome mit Thalidomid vor. Daher war eine exakte Fallzahlschätzung zum Studienbeginn nicht möglich. Die Berechnung der Stichprobengröße wurde in Bezug auf das Hauptzielkriterium, der Überlebenszeit nach Diagnosestellung, vorgenommen. Da nicht genau vorherzusagen war, wie sich das zu untersuchende Patientenkollektiv hinsichtlich der Krankheitsstadien zusammensetzen würde, wurde die Standardabweichung der Überlebenszeit als nicht bekannt vorausgesetzt. Für die Fallzahlschätzung wurde daher ein zu erwartender Unterschied in der Überlebenszeit von mindestens einer Standardabweichung angenommen. Hieraus errechnete sich eine standardisierte Differenz von 1,0 (Altman 1991). Bei einer Power der Studie von 80% ($p < 0,05$) ergab sich damit ein Stichprobenumfang von 35 Patienten pro Gruppe (Altman 1991), die in die Studie aufgenommen wurden [34]. Nach Einschluß des letzten Patienten und Abwarten der medianen Überlebenszeit wurde eine Interimsanalyse durchgeführt zur Festsetzung der endgültig notwendigen Patientenzahl oder zur Beendigung der Studie bei Vorliegen eines eindeutigen Vorteils für eine der beiden untersuchten Gruppen.

3.4. Ergebnisse

3.4.1. Krankengut

Während der Randomisierungszeit vom 01. 06.1999 – 12.11.2000 wurden 112 Patienten in die Studie aufgenommen. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug im Median 63,2 Jahre (Range 39,3-78,73 Jahre). In der Verum Gruppe lag die Altersverteilung im Median bei 65,6 Jahren (Range 39,3-78,73 Jahre), während in der Plazebo Gruppe der Median 60,0 Jahre (Range 43,9-75,2 Jahre) lag. Aufgrund vorliegender Ausschlußkriterien mußten 42 Patienten aus der Studie ausgeschlossen werden. Somit verblieben 70 Patienten (n= 70) in der Studie (51 Männer, 19 Frauen). In der Verum Gruppe wurden nach Randomisierung 34 Patienten behandelt, während 36 Patienten der Plazebogruppe zugeordnet wurden. Die Nachbeobachtungszeit betrug im Median 314 Tage (Range 16-728 Tage). 11 Patienten (6 aus der Verum Gruppe und 5 aus der Plazebogruppe) brachen die Studie ab und verblieben als Intention to treat Patienten in der jeweils randomisierten Gruppe.

3.4.2. Vergleichbarkeit der untersuchten Gruppen

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede bei der Geschlechterverteilung der einzelnen Gruppen (25 Männer und 9 Frauen in der Verum Gruppe sowie 26 Männer und 10 Frauen in der Plazebo Gruppe). Auch die Krankheitsstadien der Patienten in den Gruppen waren gut vergleichbar. Gleiches galt für das Gewicht sowie Albumin, NSE und LDH. Die Gruppenvergleiche sind zusammengefasst in Tabelle 8 dargestellt.

Gruppenvergleich			
	Verum (n=34)	Plazebo (n=36)	p-Wert
♂ / ♀	25/9	26/10	0.9
Gewicht	79,0 kg	77,5 kg	0.8
Albumin (Median)	71	72	0.07
LDH (Median)	227	285	0.09
NSE (Median)	25.7	55.0	0.21
VEGF (Median)	33	39	0.53
ASA (1/2/3)	2/26/6	2/26/8	0.9
Stadien (LD/ED)	14/20	15/21	0.1
Therapieabbruch	6	5	0.9

Tabelle 8: Gruppenvergleich zwischen 34 Verum und 36 Plazebo Patienten der prospektiv-randomisierten Thalidomidstudie.

3.4.3 Analyse des Hauptzielkriteriums Überlebenszeit

Die Analyse der Überlebenszeit ist in Abbildung 3 dargestellt. Es zeigt sich, daß bei einer Analyse aller in der Studienzeit aufgetretenen Todesfälle kein Unterschied in der Überlebenszeit ($p = 0,13$) besteht. In dieser Berechnung wurden sowohl direkt tumorassoziierte als auch nicht tumorassoziierte Todesfälle miteinbezogen. Als nicht tumorassoziierte Todesfälle galten nicht durch ein Lokalrezidiv oder Metastasenwachstum hervorgerufenen Todesfälle. Tumorassoziierte Todesfälle waren alle direkt durch Tumorprogress oder Metastasenwachstum sowie paraneoplastische Syndrome hervorgerufenen Todesfälle. Analysiert man das Patientengut unter dem Aspekt der tumorbezogenen Sterblichkeit, so zeigt sich ein signifikanter Überlebensvorteil zugunsten der Verumgruppe im Vergleich zur Plazebogruppe (Abbildung 4). 3 Patienten der Verumgruppe, die sich im Stadium ED II befanden,

überlebten länger als 2 Jahre. In der Placebo Gruppe überlebte kein Patient mit einem extensive disease Stadium länger als 13 Monate.

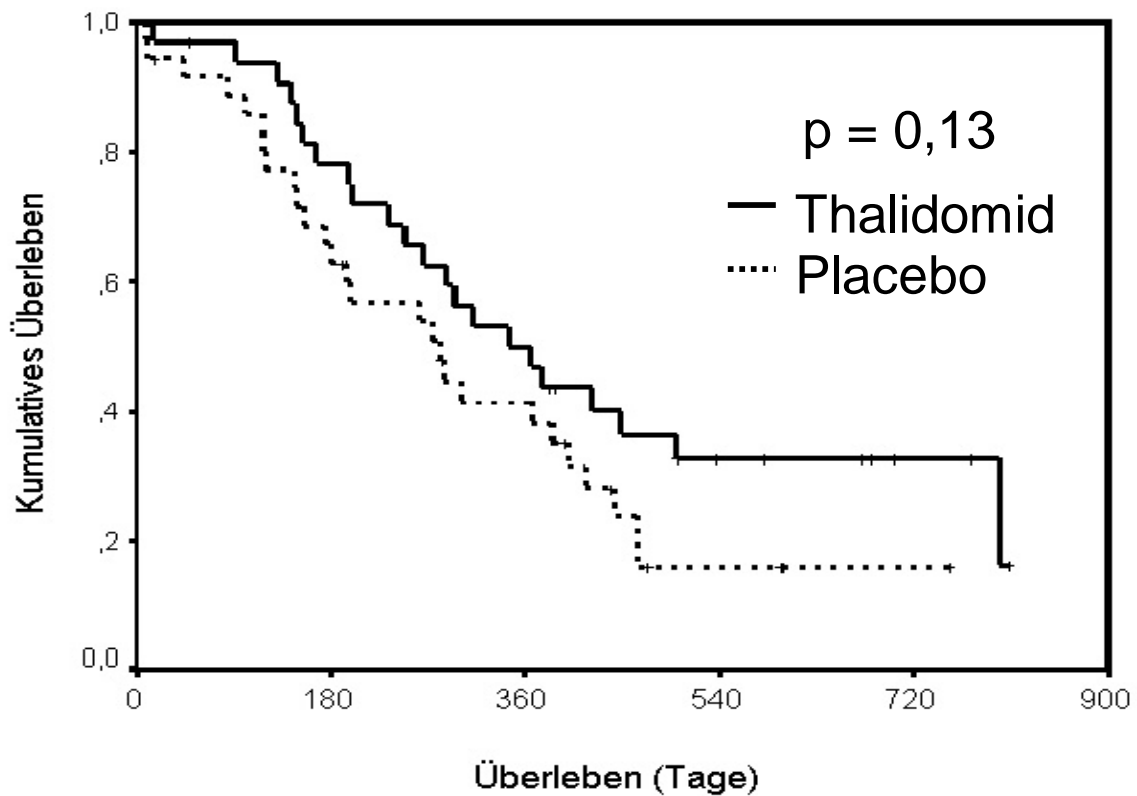


Abbildung 3: Überlebenszeit aller Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom ohne Berücksichtigung der Todesursache in der prospektiv-randomisierten Studie zur additiven Wirksamkeit der Thalidomid-Therapie ($p=0,13$ Kaplan-Meyer Analyse).

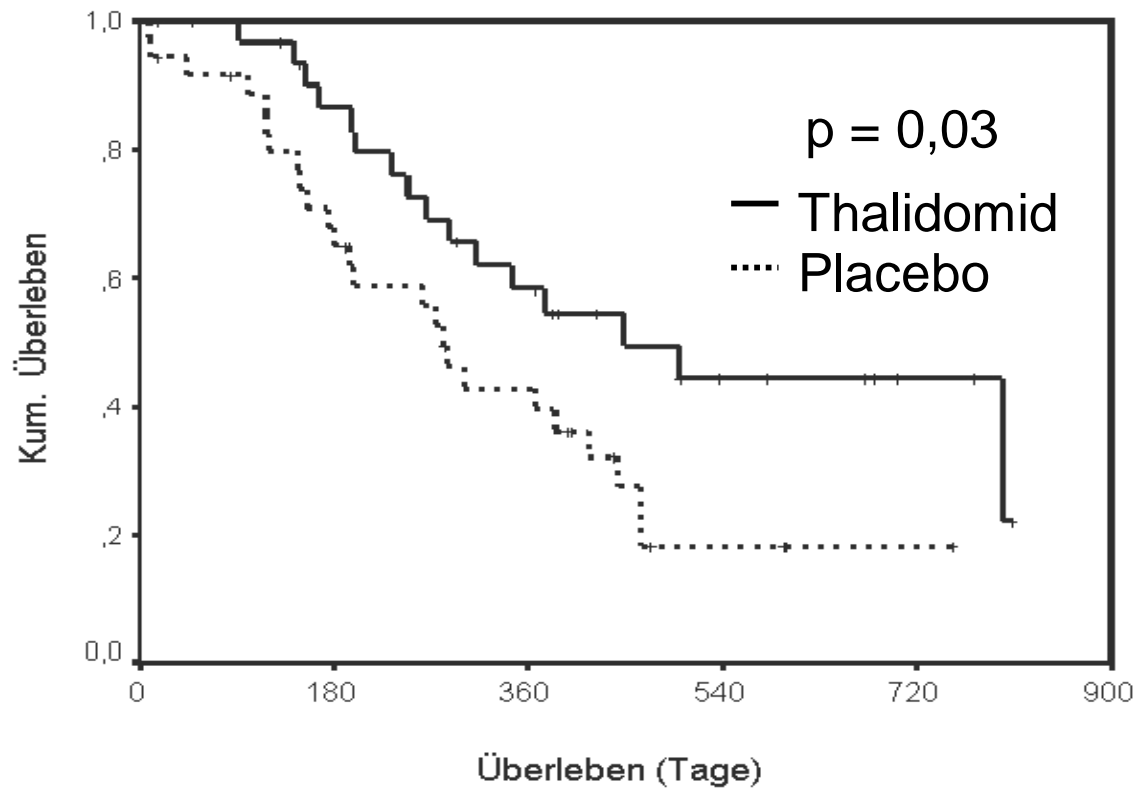


Abbildung 4: Tumorbezogene Überlebenszeit der Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom der prospektiv-randomisierten Studie zur additiven Wirksamkeit der Thalidomid-Therapie (Thalidomid n=34, Placebo n=36, p=0,03 Kaplan-Meyer Analyse).

3.4.4. Nebenzielkriterien

(Tumorstadien, Korrelation der Surrogatparameter Albumin, LDH, NSE, VEGF)

Nach der Analyse des Tumorstadium der Patienten anhand der Marburger Klassifikation befanden sich 7 Patienten im Stadium Very Limited Disease (VLD n=7), 22 im Stadium Limited Disease (LD n=22), 25 Patienten im Stadium Extensive Disease (ED) I (n=25), 12 Patienten im Stadium ED II (n=12) sowie 4 Patienten im Stadium ED III (n=4).

Die Serum VEGF-Spiegel korrelieren gut mit aufsteigenden Tumorstadien ($p < 0.0001$) (Abb 5). Die durchschnittlich niedrigeren Serum-VEGF Werte in

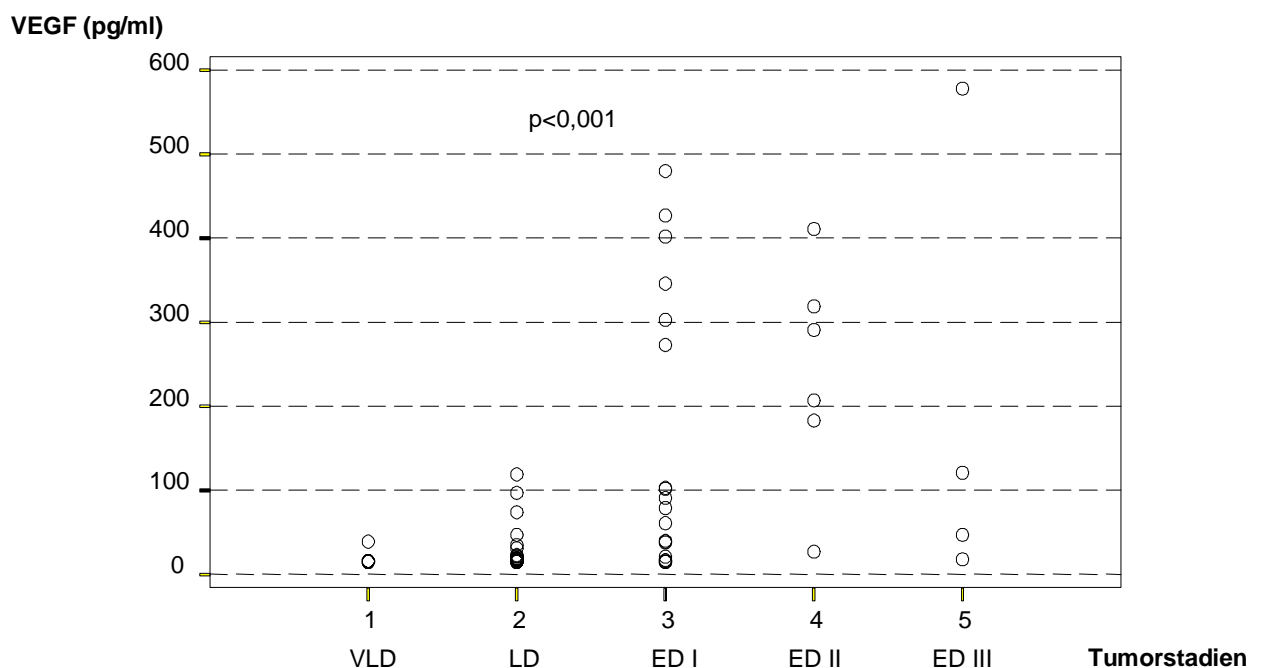


Abbildung 5; Korrelation der VEGF Konzentration im Serum mit den Tumorstadien (Marburger Klassifikation: VLD – ED III)

ED III im Vergleich zu ED II (n=12) sind durch die kleine Fallzahl der Patienten in der Gruppe ED III (n=4) zu erklären und resultieren nicht aus einem Sampling Bias. In Analogie zu den niedrigeren VEGF Werten in ED III versus ED II fanden wir auch niedrigere Durchschnittswerte für LDH und NSE in der Gruppe ED III versus ED II.

Wenn die frühen Tumorstadien VLD und LD als die nicht metastasierten Stadien zusammengefasst und mit den Gruppen ED I-III als den metastasierten Stadien der Erkrankung verglichen wurden, ergab sich ein signifikanter Unterschied der Serum VEGF Konzentration zwischen den Gruppen ($p < 0.0001$) (Abbildung 6).

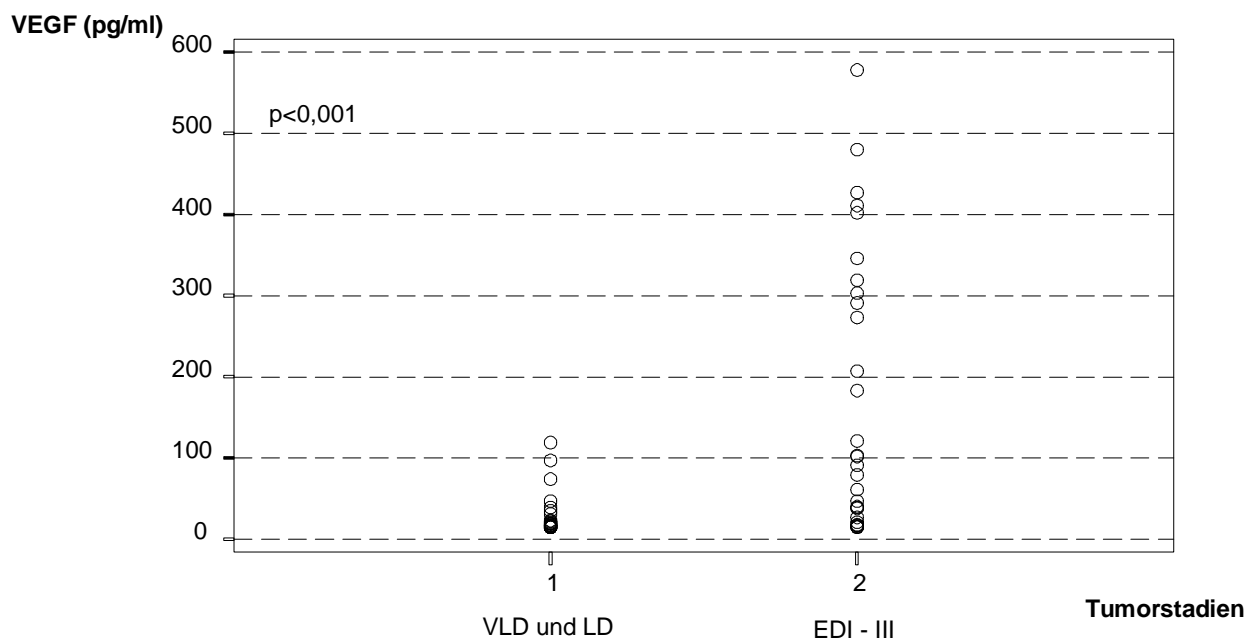


Abbildung 6; Signifikanter Unterschied der VEGF Konzentration im Serum zwischen nichtmetastasierten und metastasierten Stadien der Erkrankung ($p < 0,001$).

Stadium (n=Patienten)	Marker	Median (Range)
VLD (n=7)	VEGF (ng)	15 (15-39)
	LDH (U/L)	185 (122-223)
	NSE (ng)	13.8 (11.1-38)
	Albumin (g/L)	74 (63-78)
LD (n=22)	VEGF (ng)	19 (15-119)
	LDH (U/L)	239 (157-722)
	NSE (ng)	23 (1.3-278)
	Albumin (g/L)	72 (62-81)
ED I (n=25)	VEGF (ng)	86 (15-1070)
	LDH (U/L)	312 (107-1204)
	NSE (ng)	34 (8.3-622)
	Albumin (g/L)	72 (5-80)
ED II (n=12)	VEGF (ng)	365 (27-682)
	LDH (U/L)	369 (159-2192)
	NSE (ng)	124 (12.6-2370)
	Albumin (g/L)	70.5 (7.2-85)
ED III(n=4)	VEGF (ng)	84 (18-578)
	LDH (U/L)	265 (169-2140)
	NSE (ng)	35.5 (6.8-307)
	Albumin (g/L)	72 (70-74)

Tabelle 9: Verteilung der Tumormarker VEGF, NSE, LDH und Albumin bei unterschiedlichen Tumorstadien (Marburger Klassifikation).

Die Serum Albumin Spiegel korreliert nicht mit den unterschiedlichen Tumorstadien, jedoch fand sich eine Erhöhung von NSE und LDH im Serum mit fortschreitendem Tumorstadium.

Die Serumkonzentrationen der Surrogatparameter VEGF, NSE, LDH und Albumin bei den verschiedenen Tumorstadien sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Konzentrationen von NSE waren nur bei Patienten mit den Stadien VLD vs. ED II ($F=2.51$; $p<0.05$) signifikant unterschiedlich. Bei der Konzentration der LDH Serumlevel zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Vergleich der Gruppen VLD vs. ED II ($F=2.52$, $p<0.04$) und LD vs. ED II ($F=2.55$; $p<0.04$). Im Gegensatz dazu waren die VEGF

Serumkonzentrationen bei den Gruppen VLD vs. ED II ($p < 0.001$) und ED III ($p < 0.001$), LD vs. ED II ($p < 0.03$) ebenso wie bei den Gruppen ED II vs. EDIII ($F = 7.24$; $p < 0.001$) signifikant unterschiedlich.

Eine Korrelation zwischen VEGF und NSE ($p = 0.0036$) sowie LDH ($p = 0.018$) war statistisch gesehen vorhanden, jedoch zeigte sich bei der Ermittlung des Korrelationskoeffizienten lediglich ein Wert von 0.37 (VEGF vs. NSE, Abbildung 10) bzw. 0.24 (VEGF vs. LDH, keine Abbildung). Zwischen VEGF und Albumin ($r = 0.13$; $p = 0.30$) war keine Korrelation feststellbar.

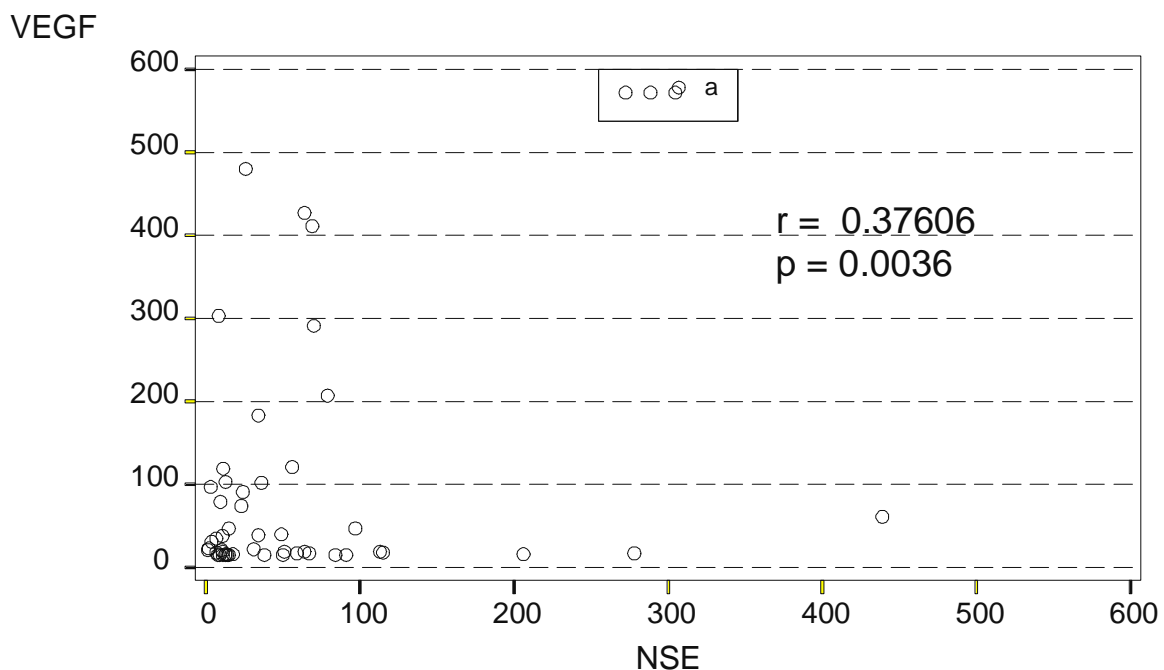


Abbildung 10; Korrelationskoeffizient von VEGF und NSE bei 70 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom.

3.4.5. Nebenwirkungen der Chemotherapie mit ACO 1 und additiver Thalidomidgabe

Die Nebenwirkungen der Therapie in der Verum Gruppe sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Klassifizierung der Nebenwirkungen erfolgte anhand der WHO Klassifikation nach Grad 1 (gering), 2 (moderat) bis hin zu schwerwiegenden Ereignissen (Grad 3 und 4). Häufige in bis zu 35 Prozent der Patienten in beiden Gruppen auftretende Nebenwirkungen waren Konstipation oder Diarrhoe, Schwindel und Mundtrockenheit. Bei 26 % der Patienten der Verum Gruppe traten ein Taubheitsgefühl oder Kribbeln an den Extremitäten (meist distal betont) im Sinne einer peripheren Polyneuropathie auf. Anlässlich der konsiliarischen Vorstellung der Patienten bei einem neurologischen Facharzt konnte nicht differenziert werden, ob die Neuropathie durch Vincristin oder Thalidomid hervorgerufen wurde.

Nebenwirkung	N = Patienten (Prozent)
Konstipation	12 (35)
Diarrhoe	10 (29)
Muskelschwäche und Müdigkeit	4 (12)
Somnolenz	3 (9)
Taubheitsgefühl u. Kribbeln der dist. Extr.	9 (26)
Verwirrtheit	2 (6)
Hautausschlag	1 (3)
Stimmungsschwankungen	6 (18)
Koordinationsschwierigkeiten	2 (6)
Mundtrockenheit	4 (12)
Übelkeit, Schwindel,	14 (41)
Ödeme	5 (14)

Tabelle 10: Nebenwirkungen der additiven Thalidomidtherapie bei 34 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom.

Während Konstipation in der Verumgruppe (34% vs 16%, $p < 0,05$) häufiger auftrat, war in der Plazebogruppe ein gehäuftes Auftreten von Diarrhoe (35% vs 29%, $p < 0,05$) zu beobachten. Die Rate an distal betonter symmetrischer peripherer Neuropathie lag in der Verum Gruppe höher, jedoch war der Unterschied statistisch nicht signifikant.

Nebenwirkung	N = Patienten (Prozent)
Konstipation	5 (16)
Diarrhoe	12 (35)
Muskelschwäche und Müdigkeit	4 (12)
Somnolenz	1 (4)
Taubheitsgefühl u. Kribbeln der dist. Extr.	8 (24)
Verwirrtheit	2 (6)
Hautausschlag	1 (4)
Stimmungsschwankungen	8 (24)
Koordinationsschwierigkeiten	2 (6)
Mundtrockenheit	3 (8)
Übelkeit, Schwindel,	14 (39)
Ödeme	5 (14)
Leukopenie	1 (4)

Tabelle 11: Nebenwirkungen in der Plazebogruppe bei 36 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom.

Alle gastrointestinalen Nebenwirkungen der Therapie wurden symptomatisch therapiert. Nach neurologischer Untersuchung wurden die Patienten mit peripherer Neuropathie durch Vitamin B Komplex Gabe therapiert. Insgesamt erschien

die Differenzierung zwischen Nebenwirkungen, die rein Thalidomid assoziiert waren und solchen, die durch die ACO 1 Chemotherapie bedingt waren, sehr schwierig. Die Nebenwirkungen der Patienten der Kontrollgruppe sind in Tabelle 11 dargestellt. Ein Patient entwickelte 10 Tage nach Eintritt in die Studie eine schwere Leukopenie und verstarb am 14. Tag im septischen Multiorganversagen. Nachdem die Verblindung anlässlich der rapiden Verschlechterung des Allgemeinzustandes am 10. Tag aufgehoben worden war zeigte sich, daß der Patient in der Plazebogruppe randomisiert worden war und die Leukopenie nicht auf die additive Therapie mit Thalidomid zurückzuführen war.

3.5. Diskussion

Die 5-Jahres-Überlebensraten von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom sind extrem schlecht. In einer durch Lassen, Osterlind und Mitarbeiter 1995 publizierten retrospektiven Studie an 1714 konsekutiven Patienten überlebten lediglich 3,5% der Patienten 5 Jahre, und nur 1,8% der untersuchten Patienten lebten noch nach 10 Jahren {120}. Ohne Therapie beträgt die mediane Überlebenszeit in den meisten Studien stadienabhängig lediglich zwischen 1.5 bis 5 Monaten {93,94,95,96,97,98,99,100}.

Lungengewebe ist durch eine hohe Gefäßdichte gekennzeichnet und funktionell abhängig von einer intakten Gefäßarchitektur. Es ist bekannt, daß Endothelzellen organabhängig phänotypische Unterschiede aufweisen. Ebenso konnte gezeigt werden, daß pro- und antiangiogene Faktoren in unterschiedlichen Organen verschieden wirksam werden {125}. Darüberhinaus berichteten Wong und Mitarbeiter sowie Yamashita et al. über unterschiedliche Bedeutungen einzelner angiogener Zytokine bei kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen {126,127}. Es war somit vor der Durchführung dieser Studie nicht vorhersehbar, ob Patienten mit einem kleinzelligem Bronchialkarzinom von einer additiven Thalidomidtherapie profitieren würden.

Vielen anderen Tumorentitäten vergleichbar konnte auch für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom an immunhistochemischen Präparaten eine Korrelation erhöhter Tumorgefäßdichte mit einer schlechteren Prognose gezeigt werden. Jedoch existieren auch mehrere Studien die keinen Zusammenhang zwischen Gefäßdichte und Prognose der Patienten fanden (Tabelle 12). Die hohe Proliferationsrate (Tumorverdoppelungszeit 10-50 Tage) und frühzeitige lymphogene und hämatogene Disseminationstendenz des kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) ist die Rationale für eine mögliche Wirksamkeit

des Angiogenesehemmers Thalidomid bei dieser Tumorentität. Könnte der Anschluß der Tumorgefäße an das Wirtsgefäßsystem durch Thalidomid verhindert werden, wäre eine Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten möglich. Zusätzlich könnte eine Behinderung der Integrinvernetzung durch Thalidomid sowohl der Endothelzellen im Tumor als auch der Karzinomzellen untereinander zu einer Verlangsamung des Karzinomwachstums führen.

In der Literatur gibt es Hinweise auf eine Korrelation zwischen erhöhten Serum VEGF-Spiegeln und dem Auftreten von Bronchialkarzinomen. {90,91,92}. Es ist jedoch nicht klar, ob die Erhöhung des VEGF Spiegels mit dem Ausmaß der Tumorerkrankung korreliert.

Schlechte Prognose	Keine Relation zur Prognose
Macchiarini, Lancet 1992	Pastorino, JCO 1997
Yamosaki, Cancer 1994	Apolinario, JCO 1997
Fontanini, J Pathol 1995	Chandrachud, Br J Cancer 1997
Kawaguchi, Anticancer Research 1997	Decaussin, J Pathol 1999
Fontanini, JNCI 1997	Macluskey, Anticancer Res 2000
Duarte, J Thorac Cardiovasc Surg 1998	
Dazzi, Lung Cancer 1999	
O`Byrne, Br J Cancer 2000	

Tabelle 12: Unterschiedliche Studienergebnisse zur Beziehung zwischen Angiogenesecore und Prognose bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom.

Trotz initial guter Ansprechraten auf die gängigen Kombinationen der angewandten Chemotherapeutika ist die Rezidivrate sehr hoch. Der bedeutendste prognostische

Parameter für die Patienten ist das Stadium der Erkrankung {89-100}. Erhöhte Serumspiegel der Parameter Laktatdehydrogenase (LDH), Neuron Spezifische Enolase (NSE) oder Albumin dienen als zusätzliche prognostische Marker, jedoch ist ihre Bedeutung im klinischen Alltag nicht unumstritten {101,102}. In einer Metaanalyse aus dem Jahr 1999 fanden Watine und Mitarbeiter lediglich Albumin als unabhängigen prognostischen Marker im Gegensatz zu NSE und LDH {101}.

Der Wert des angioneogenetisch wirksamen Zytokins VEGF (vascular endothelial growth factor) als prognostischer Marker ist bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom nicht geklärt. Es liegen nur ungenügende, teilweise widersprüchliche Daten bezüglich einer Korrelation von erhöhten VEGF Spiegel und erhöhten Tumorstadien vor { 90-92,103}. In dieser Studie an 70 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom konnte eine Korrelation bezüglich der Tumorstadien und einem erhöhten VEGF Spiegel nachgewiesen werden.

Sollte sich diese Beobachtung in weiteren Untersuchungen bestätigen lassen, würde dem VEGF als prognostischem Marker für das kleinzellige Bronchialkarzinom in mehrfacher Hinsicht große Bedeutung zukommen. Einerseits könnte eine prognostische Aussage getroffen werden, andererseits wäre es möglich Patienten mit erhöhten VEGF Spiegel zu identifizieren, die von einer antiangiogenetischen Therapie profitieren könnten. Darüberhinaus wäre der Effekt einer eventuellen Therapie mit Angioneogenesehemmern die die Produktion von VEGF reduzieren durch die Kontrolle der Serumspiegel von VEGF möglich. Die Serum Spiegel von VEGF korrelierten in der gezeigten Untersuchung gut mit den Tumorstadien der Marburger Klassifikation. Diese Beobachtung könnte in Zukunft enormen Einfluss in der Diagnostik, Therapie und

Prognose von Patienten mit dieser Tumorerkrankung haben. In einer Metaanalyse aus 45 Studien konnten Watine und Mitarbeiter zeigen, daß etablierte „neuere“ Marker wie z. B. NSE keine Verbesserung der prognostischen Aussage im Vergleich zu älteren Markern (Albumin, LDH) ermöglichen {101}. Berichte über die Serum VEGF Konzentrationen bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom sind in der Literatur selten. Takigawa und Mitarbeiter untersuchten 70 Patienten mit Bronchialkarzinomen (45 Nicht-kleinzellig, 25 Kleinzellig) und fanden dabei erhöhte VEGF Serumkonzentrationen im Vergleich zu 13 Patienten mit benignen Lungenerkrankungen {91}. Obwohl sieben von acht Patienten mit metastasierten Tumorstadien beim kleinzelligen Bronchialkarzinom erhöhte VEGF Serumspiegel aufwiesen, konnte in der Untersuchung jedoch keine statistisch signifikante Beziehung zwischen dem Stadium der Erkrankung und der Höhe des VEGF Spiegels gemessen werden. Im Unterschied zu dieser Studie fanden Salven und Mitarbeiter {90} erhöhte VEGF Serumspiegel bei fortgeschritteneren Tumorstadien bei 68 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom. Jedoch wurde VEGF in dieser Studie nicht mit anderen prognostischen Markern verglichen, und nur ein Patient (1.5%) befand sich im Stadium Very limited Disease während 44 Patienten (65%) eine metastasierte Erkrankung aufwiesen. Dennoch war ein niedriger VEGF Spiegel in der Salven Studie ein unabhängiger prognostischer Marker für ein längeres Überleben nach multivariater Analyse {90}.

Die Steuerung intrinsischer und extrinsischer Sekretion angioneogenetischer Faktoren wie z.B. des VEGF und PDGF ist bisher nicht vollständig geklärt. Karzinome sind in der Lage angioneogenetische Faktoren autokrin zu sezernieren. In einer immunhistochemischen Studie an 45 Brustkrebspräparaten fanden De Jong und

Mitarbeiter eine autokrine Sekretion in 22% im Vergleich zu einem parakrinem Sekretionsmechanismus in 40% der untersuchten Präparate {104}. Es ist mittlerweile unumstritten, daß eine erhöhte VEGF Konzentration immunhistochemisch in ca. 85% aller Tumorpräparate nachweisbar ist {22,105}. Darüberhinaus sind unter anderem Endothelzellen, Thrombozyten und Makrophagen in der Lage, angiogene Faktoren zu sezernieren {106}. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß präsynthetisiertes VEGF in Thrombozyten gespeichert und nach Zellstimulation exozytiert wird {107,108}. Stimuli können durch Tumorzellen hervorgerufen werden, aber auch durch andere Zytokine oder Makrophagen und während inflammatorischer Reaktionen. Obwohl in der vorliegenden Untersuchung nicht zwischen den möglichen verschiedenen Ursprungsorten des gemessenen VEGF unterschieden wurde, könnten die erhöhten Spiegel eine wichtige prognostische Rolle im Verlauf der Erkrankung spielen.

Die dargelegten Studienergebnisse zeigen eine bessere Korrelation der Serum VEGF-Spiegel mit dem Tumorstadium bei 70 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom als derzeit gängige prognostische Marker wie NSE, LDH oder Albumin. In der multivariaten Analyse war das Serum VEGF ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Stadium der Erkrankung. Die gezeigten Daten bestätigen, daß die Konzentration von VEGF mit höheren Tumorstadien ansteigen. Daher läßt sich schlußfolgern, daß Serumkonzentration von VEGF gut mit dem Stadium und der Tumorlast korreliert und bessere Marker für den Grad der Erkrankung darstellten als NSE, LDH oder Albumin. Dennoch muß die Relation zwischen erhöhten prätherapeutischen Serumkonzentrationen von VEGF und der Prognose von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom noch genauer untersucht werden. Nach den vorgestellten Ergebnissen scheint es jedoch denkbar, daß Patienten mit einem hohen prätherapeutischen Serum-VEGF von einer antiangiogenetischen Therapie additiv zur

Standardkombinationschemotherapie profitieren könnten. Dadurch könnten eventuell diejenigen Patienten bereits prätherapeutisch identifiziert werden, die später von einer antiangiogeneogenetischen Therapie profitieren könnten.

Auf die Studien zum therapierefraktären multiplem Myelom und Thalidomidtherapie wurde an anderer Stelle dieser Monographie bereits eingegangen. Der Einsatz des Medikaments ist auch bei anderen myeloproliferativen Erkrankungen untersucht worden. Dimopoulos und Mitarbeiter sahen bei Patienten mit Makroglobulinämie (M. Waldenström) einen Rückgang von IL-6 und eine Reduktion der benötigten Prednisolondosis von 100mg auf 5mg/d {228}. Auch beim myelodysplastischen Syndrom (MDS) wurde die Gabe von Thalidomid unter Studienbedingungen untersucht. Die intramedulläre Apoptose von Knochenmarkzellen, die für die Zytopenie bei MDS-Patienten verantwortlich ist, wird wahrscheinlich TNF- α vermittelt. Daher könnte die Gabe von Thalidomid zur Inhibierung der TNF- α Produktion ein sinnvoller Therapieansatz sein. Raza und Mitarbeiter sahen in einer Studie an 83 Patienten mit MDS zwar keine Vollremissionen unter 100-400 mg Thalidomid/d, jedoch zeigte sich bei 16 Patienten eine Verbesserung der hämatologischen Situation (keine Transfusionsnotwendigkeit bei 10 Patienten, geringere Anzahl von Thrombozytenkonzentraten, höhere Thrombozytenzahlen) {229}. Bei aphtösen Ulcera die bei Patienten mit Kaposi Sarkom auftraten wurde die Gabe von Thalidomid zur Regression der Läsionen von Fife und Mitarbeitern sowie der Arbeitsgruppe um Little untersucht. Die Erstgenannten sahen bei sechs von siebzehn Patienten, die an AIDS related Kaposi-Sarkom litten, einen Rückgang der Ulzerationen und eine Reduktion

des Virusload bei drei von siebzehn untersuchten Patienten {230}. In einer Phase II Studie an 20 Patienten mit progredientem Kaposi-Sarkom, die mit Thalidomid (initial 200mg/d – 1000mg/d, im Durchschnitt 500mg/d) behandelt wurden, sahen Little et al. bei 10 Patienten eine Verbesserung der klinischen Symptomatik (8 Partialremissionen, 2 Vollremissionen) {231}. In einer Untersuchung an 12 Patienten mit Mammakarzinomen, die 100mg / d Thalidomid erhielten, beobachtete Eisen keine Remission oder eine objektivierbare Linderung von Symptomen der Erkrankung {232}. Ebenso konnten Baidas und Mitarbeiter in einer anderen Dosis-Eskalations-Studie, bei der die Dosierung zwischen 200 – 1200mg / d Thalidomid lag, kein Ansprechen der Erkrankung auf die Therapie feststellen {233}. In diese Studie wurden ausschließlich exzessiv chemo/strahlentherapeutisch vorbehandelte Patientinnen mit einem metastasiertem Stadium der Erkrankung aufgenommen. Nguyen et al. therapierte 7 Patientinnen, die sich ebenfalls im metastasiertem Stadium befanden {233}. Er sah bei 5 Patientinnen eine partielle Remission oder Stabilisierung der Erkrankung. Jedoch muß angemerkt werden, daß neben den kleinen Patientenzahlen der Studien das Medikament als einziges Agens verabreicht wurde, und die Dauer der Therapie meist lediglich zwischen 2-6 Monaten lag. Möglicherweise sind bessere Resultate in der Therapie des Mammakarzinoms durch eine Kombination von Thalidomid mit Chemotherapeutika und einer längeren Dauer der Therapie zu erwarten.

Es liegen derzeit keine gesicherten Erkenntnisse zur Wirksamkeit einer additiven Therapie mit Angiogenesehemmern bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom vor. In der vorliegenden Studie konnte erstmals eine Verlängerung

der Überlebenszeit in einer prospektiven randomisierten Studie an 70 Patienten nachgewiesen werden. In Zeiten des ständig steigenden Kostendrucks in der Medizin sollte nicht unerwähnt bleiben, daß diese therapeutische Verbesserung durch die Gabe eines kostengünstigen Medikaments ohne eine deutliche Erhöhung der Nebenwirkungen der generellen Therapie erreicht wurde. In den dargelegten Studienergebnissen war keine signifikante Erhöhung thalidomidspezifischer Nebenwirkungen erkennbar. Neben dieser bedeutenden Erkenntnis für die Therapie konnten in der Studie weitere wichtige Aspekte einer möglichen antiangiogenetischen Therapie untersucht werden. So konnte gezeigt werden, daß die Serumspiegel des angiogenen Zytokins VEGF gut mit den Tumorstadien der Patienten korrelieren. Zur Zeit ist das Staging der Patienten das einzige valide prognostische Instrument zu einer Therapieplanung und zum Vergleich der Therapieergebnisse. Ob die Bestimmung der VEGF Spiegel prätherapeutisch eine Rolle in der Identifikation der Patienten spielen könnte, die später auch von einer antiangiogeneogenetischen Therapie profitieren, konnte durch die Untersuchung nicht geklärt werden. Auch ob das Ansprechen auf die Therapie durch die Kontrolle der VEGF Spiegel im Verlauf möglich ist, müßte in einer neuen Studie untersucht werden.

4. In vitro Versuche zur Hemmung der Proliferation von Kaninchenendothelzellen durch Thalidomid

Die Wirkung von Thalidomid auf Endothezellen wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Thalidomid hemmt in vitro die bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) und VEGF induzierte Angiogeneese im Kaninchen Korneamodell {130}. Jedoch gelang es im Gegensatz dazu Vesela und Mitarbeitern nicht, eine Hemmung von bFGF induzierter Angiogeneese im Hühnerei allantoismodell nachzuweisen {128}. In einer anderen Studie, die von Gutman und Mitarbeitern an Mäusen, denen B16 F-10 Melanomzellen subkutan implantiert worden waren, durchgeführt wurde, gelang eine Hemmung des Melanomwachstums durch Thalidomid nicht {80}. Bauer et al. konnten nachweisen, daß eine Hemmung von humanem Endothelzellwachstum durch Thalidomid nach oraler Verabreichung nur speziesspezifisch gelingt {129}. Diese Arbeitsgruppe sah nur eine in-vitro Proliferationshemmung von humanen aortalen Endothelzellen durch Thalidomid, wenn die Endothelzellen mit menschlichen oder Kaninchenlebermikrosomen koinkubiert worden waren. Bei Ratten- bzw. Mäusemikrosomen hingegen konnte kein inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden. Sie schlußfolgerten, daß eine metabolische Aktivierung durch Thalidomid notwendig sei, um die antiangiogeneetischen Effekte von Thalidomid nachzuweisen.

Aufgrund dieser widersprüchlichen Berichte aus der Literatur untersuchten wir deshalb die Wirkung von Thalidomid auf Kaninchenendothelzellen in-vitro. Um die Wirkung von metabolisiertem und nicht metabolisiertem Thalidomid auf Kaninchenendothelzellen zu untersuchen, wurde der folgende in-vitro Proliferationsassay durchgeführt.

4.1. Material und Methoden

Nach erteilter Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheitsschutz und technische Sicherheit des Senats von Berlin wurden 6 weibliche New Zealand White Kaninchen (Charles River Wiga Ansbach, Deutschland) mit einem Gewicht von 2.5 bis 3 kg in der tierexperimentellen Abteilung der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Campus Mitte unter Standardbedingungen bei Futter und Wasser ad libitum gehalten. Nach einer Akkomodationszeit von einer Woche wurde 3 Tieren eine Medikation von 50mg/kg KG Thalidomid einml täglich oral per Knopfkanüle verabreicht. 3 Tiere dienten als Kontrollgruppe. Thalidomid wurde durch die Firma Grünenthal (Grünenthal AG, Aachen Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden täglich gewogen, die Körpertemperatur gemessen und auf ihren Aktivitätsstatus untersucht. Nach 1 weiteren Woche wurden die Tiere mit einer Ketanest Rompun Narkose betäubt (im. Injektion von Ketaminhydrochlorid (50 mg/kg Hoechst AG, Frankfurt/Main, Deutschland und Xylazin (5 mg/kg Bernburg AG, Bernburg, Deutschland). In Rückenlage erfolgte die Desinfektion mit Betaisodona und die sterile Abdeckung des Abdomens unter OP-Bedingungen. Nach einer 5cm langen Laparotomie erfolgte zunächst die Entnahme von 40 ml Blut aus der Vena cava inferior durch Punktion mit einer sterilen Kanüle. Danach wurde die V. Cava inferior bis zum Diaphragma disseziert und unter Klemmen reseziert. Das entnommene Veneresektat wurde in PBS Pufferlösung plaziert. Danach wurden die Tiere durch Injektion einer hypertonen Kaliumchloridlösung getötet.

Die Weiterverarbeitung des autologen Kaninchenvollbluts erfolgte durch Zentrifugieren bei 3000 U/min, Hitze induzierter Inaktivierung und steriler Filtration des Überstandes. Zur Isolierung der Kaninchenendothelzellen aus dem Venenresektat wurde dies

zunächst für 15 Minuten mit Collagenase P (1 U/ml, (Boehringer, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Sodann wurden die Endothelzellen vorsichtig von der Intima der Venenwand gelöst. Isolierte Zellen einer Vene wurden in vier identische Teile aufgeteilt und auf unbeschichteten Multiwellplatten inkubiert.

Die Testung der Proliferationshemmung der in Kultur befindlichen

Kaninchenendothelzellen wurde mit vier verschiedenen Testmedien in Zusammenarbeit mit der Firma Cell Lining® (Rudower Chaussee 29, 12489 Berlin) durchgeführt.

(Darstellung des Versuchsablaufs in Abb. 11)

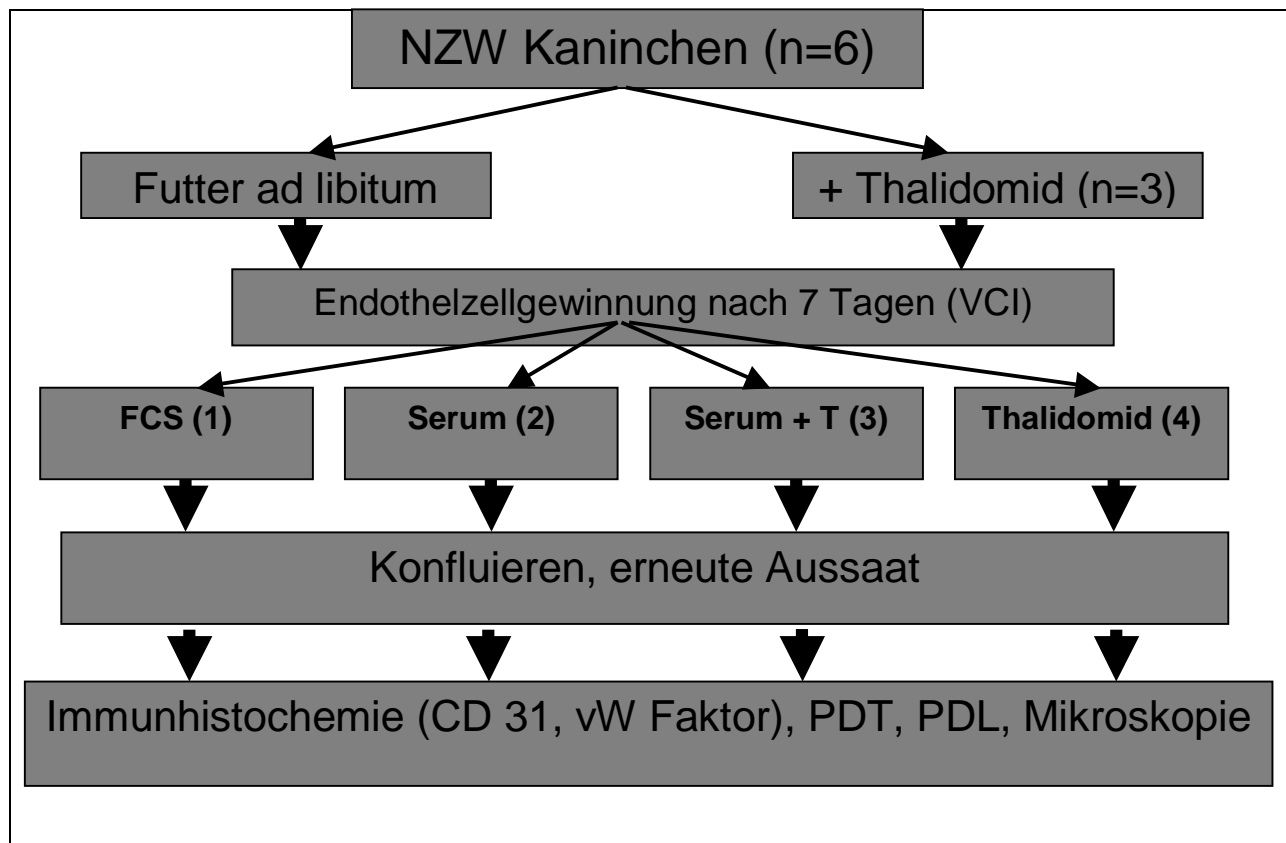


Abbildung 11: Versuchsablauf zur Überprüfung der Wirkung von Thalidomid auf Kaninchen-Endothelzellen (NZW= New Zealand White Kaninchen, FCS= Fetales Kälber Serum, Serum= Kaninchen Serum ohne Thalidomid, Serum + T= Kaninchen Serum mit Thalidomid, PDT= Population Doubling Time, PDL= Population Doubling Level)

Als Basismedium diente Dulbecco's modifiziertes Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) supplementiert mit 4 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100 U/100 µg /ml Penicillin/Streptomycin, 0,05 µg/ml Amphotericin B (Biochrom, Berlin, Deutschland), 50 U/ml Heparin (Biochrom, Berlin, Deutschland).

Zusätzlich zu diesem Medium erhielt die erste Testserie

1. 10 % Kälberserum (FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland) (FCS = Gruppe1)
2. 10 % Kaninchenserum ohne Thalidomid (S = Gruppe 2)
3. 10 % Kaninchenserum mit Thalidomid (T = Gruppe 3)
4. Reines Thalidomid 5.16 mg/ml DMSO (P= Gruppe 4)

Alle Versuche wurden wiederholt durchgeführt.

In einem zweiten Teil des Experiments wurden zuvor mit metabolisiertem Thalidomid in Kaninchenserum inkubierte Kaninchenendothelzellen mit 10 % igem FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland) ohne Thalidomid inkubiert, um die Reversibilität der Proliferationshemmung durch das Medikament zu untersuchen.

Die Zellidentität wurde in situ durch Immunhistochemische Färbung mit von Willebrand/Factor VIII (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) mittels des EnVision™ AP Detektionssystem (Dako, Hamburg, Deutschland) nachgewiesen. Mikroskopisch wurde die typische kopfsteinpflasterartige Anordnung in konfluenter Monolayerschicht in der Kulturschale überprüft. Die Kulturen wurden regelmäßig auf Kontamination mit Mycoplasmen und anderen Bakterien durch einen Fluoreszenzkit (Biochrom, Berlin, Deutschland) untersucht.

Bevor die Zellen komplett konfluieren, wurden sie trypsinisiert, ausgewaschen, geteilt und erneut ausgesät. Die Zellzahl und Viabilität wurde mittels eines elektronischen Zellsystems (Casy Counter®, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) bei

jeder Zellpassage erfasst und in eine Excel Datenbank (Microsoft Windows 98®) eingegeben. Bei jeder Passage wurden die Zellen mikroskopisch untersucht und Photodokumentationen der Kulturen erstellt. Diese Methoden sind in der Firma Cell Lining® etabliert und anerkannte Methoden zur Untersuchung der Endothelzellproliferation {52}. Um die Proliferationsaktivität der Kaninchenendothelzellen in den unterschiedlichen Kulturmedien vergleichen zu können, wurden der Population doubling level (PDL) und die Population doubling time (PDT) kalkuliert. Für die Berechnung des PDL (population doubling level, Generationszahl) und der PDT (population doubling time, Verdopplungszeit) wurden folgende Annahmen getroffen. Die Primärzellen vermehren sich durch exponentielles Wachstum. Ausgehend von einer einfachen Teilung der Mutterzelle in zwei Tochterzellen ergeben sich aus einer Ausgangszellzahl von N_0 Zellen nach n Teilungen N Zellen. Mathematisch ergibt sich daraus

$$N = N_0 \cdot 2^n. \text{ Hieraus folgt nach Umformung } \lg N = \lg N_0 + n \cdot \lg 2.$$

$$\text{Der PDL berechnet sich demnach als } n = \text{PDL} = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2$$

Die für einen Teilungszyklus benötigte Verdopplungszeit berechnet sich demnach als

$$\text{PDT [h]} = t \text{ [h]} / \text{PDL}$$

Hierbei ist t die Zeitdauer zwischen den Messungen der Ausgangszellzahl N_0 und der Endzellzahl N .

Die statistische Auswertung wurde mit dem SAS 8.0® System für Windows 98® durchgeführt. Die Werte wurden auf ihre Normalverteilung mit dem Spearman's log rank Korrelationstest überprüft. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann Whitney U test oder T-test für kontinuierliche Daten erfasst. P Werte kleiner als 0.05 wurden als signifikant angesehen.

4.2. Ergebnisse

Alle Tiere tolerierten die Versuchsmedikation gut. Es traten bei keinem Tier Fieber oder Gewichtsverlust von mehr als 10 Gramm auf. Die Venenentnahme war unkompliziert. Die Isolation der Kaninchenendothelzellen aus den Venensegmenten führte zu einer vergleichbaren Anzahl von Zellen bei allen 6 Tieren. (zwischen 81.000 bis 129.000 Zellen mit einer Zellvitalität von 70-88 %).

Zellzählung Die Zellen der Gruppe 1 proliferierten in 12 Tagen zu einem Medianwert von 212.000 (Range 190.100-234.100) (Abb 12). Eine deutliche Proliferationshemmung war in Gruppe 3 zu erkennen mit einer medianen Zellzahl von 21.500 (Range 13.000-26.500) am 12. Tag.

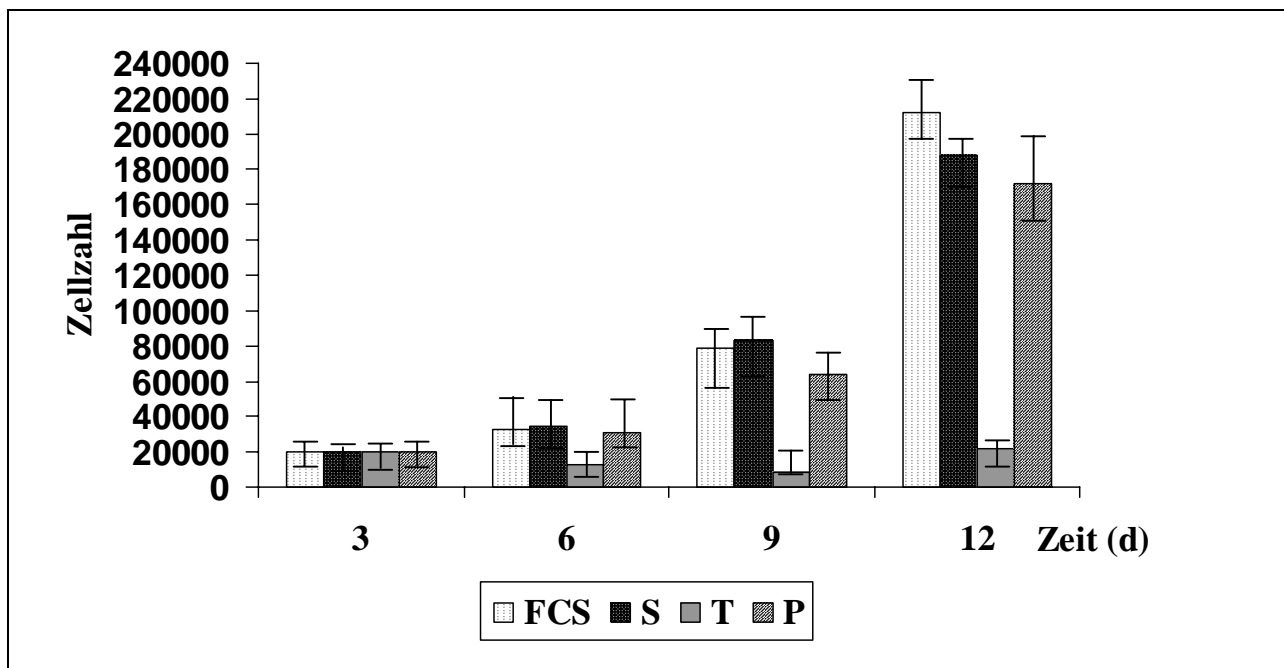


Abbildung 12: Kaninchenendothelzellproliferation unter verschiedenen Testseren. Unter Fetalem Kälber Serum (FCS), mit normalem Kaninchenserum (S), sowie mit reinem nicht metabolisiertem Thalidomid (P) kam es zu keiner Proliferationshemmung. Im Gegensatz dazu führte der Zusatz von metabolisiertem Thalidomid (T) zu einer deutlichen Proliferationshemmung ($p < 0,001$).

Die Zellen, die mit normalem Kaninchenserum ohne Thalidomid (S) inkubiert wurden, wiesen die gleichen Wachstumscharakteristika wie die Kontrollzellen auf. Reines, nicht durch Kaninchen metabolisiertes Thalidomid hatte keinen inhibierenden Effekt auf die Proliferationsrate der Kaninchenendothelzellen.

Population doubling level (PDL). Die Anzahl der Zellgenerationen in einer gegebenen Zeit wies in den 3tägigen Intervallen eine große Variationsbreite auf.. In Gruppe 1 stieg der PDL von 1.5 (Median, Range 1,3 - 1,7) am 3. Tag auf Werte von 4.5 (Range 4,0 - 5,2) am 12. Tag an. Der PDL in Gruppe 3 variierte von -0,7 am dritten Tag auf 0,8 am zwölften Tag. In den Gruppen 2 und 4 zeigten sich wie bei den Proliferationszellzahlen ähnliche Ergebnisse wie in Gruppe 1.

Population doubling time (PDT).

Die Verdopplungszeiten der kultivierten Zellen stieg in Gruppe drei von 61h am dritten Tag auf 272 h am zwölften Tag an (Abb. 13). Bei den anderen Gruppen war eine Verminderung der PDT zwischen 60 h am dritten Tag bis hin zu 38 h am 12. Tag zu beobachten.

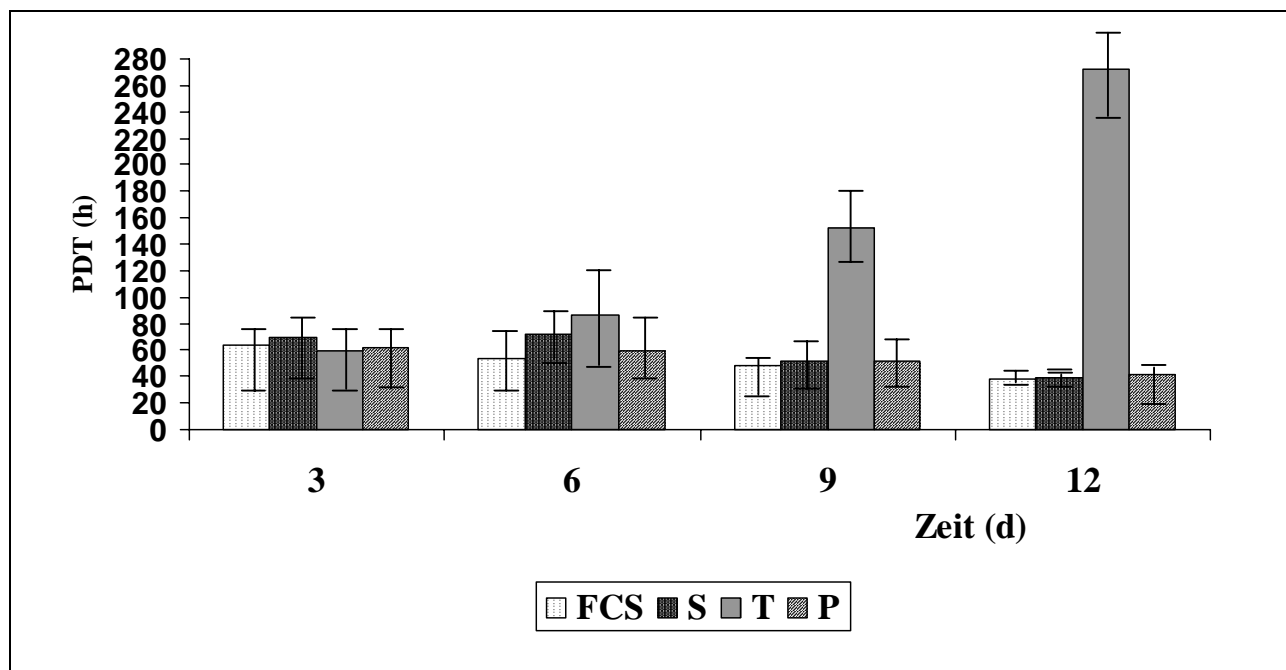


Abbildung 13: Kaninchenendothelzellproliferationszeit unter verschiedenen Testseren. Im Gegensatz zu Fetalem Kälber Serum (FCS), normalem Kaninchenserum (S) und reinem Thalidomid (P) dazu führte der Zusatz von metabolisiertem Thalidomid (T) zu einer deutlichen Verlängerung der Zeit bis zur Verdopplung einer Generation (PDT) ($p < 0,001$, Vergleich FCS vs T).

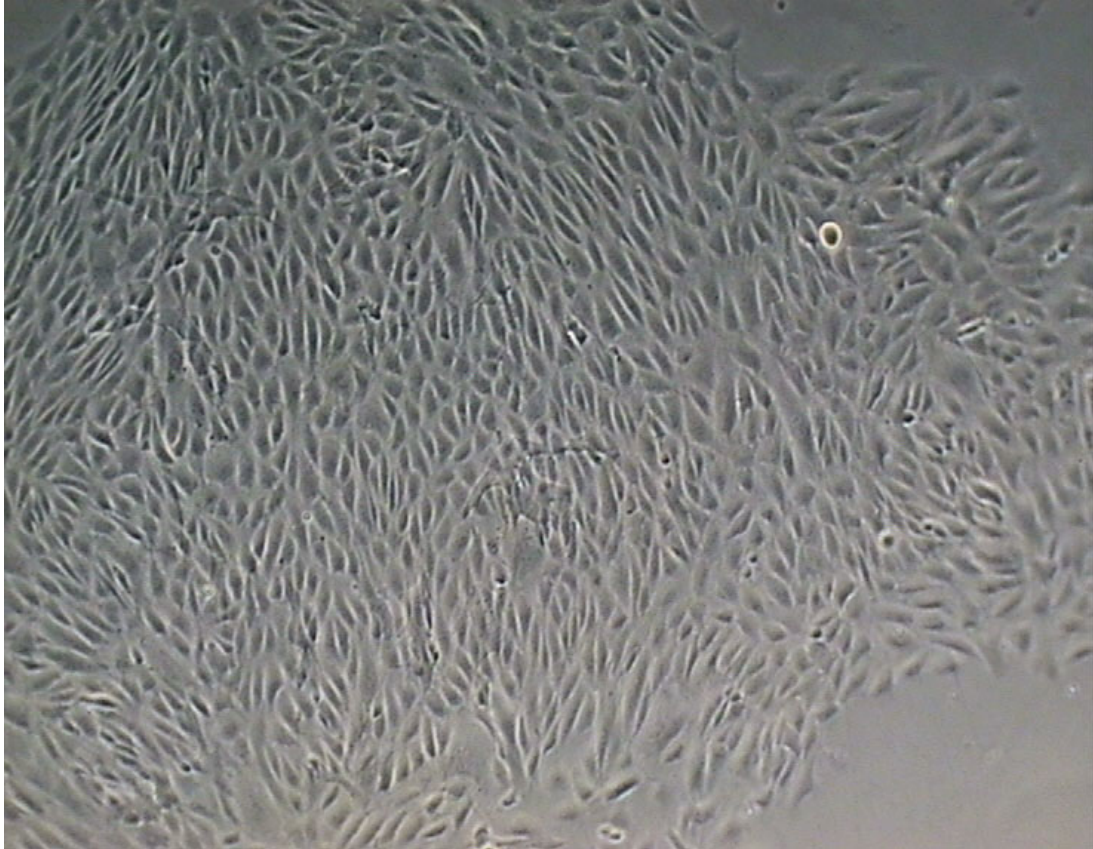


Abbildung 14: Normal konfigurierte Kaninchenendothelzellen nach 12 tägiger Kultivierung in FCS (Fetales Kälber Serum). Erkennbar das typische Kopfsteinpflastermuster und die ovaläre Zellform mit normaler Zellarchitektur (200 fache Vergrößerung Lichtmikroskop).

Zellviabilität und mikroskopische Beurteilung der Endothelzellkulturen.

Die morphologischen Veränderungen unter den verschiedenen in-vitro Therapieformen sind in Abbildung 14 und 15 dargestellt. Während die mit FCS unter Standardbedingungen kultivierten Zellen (Abb. 14) nach 12 Tagen ein typisches Konfluenzmuster aufwiesen und ein sogenanntes Kopfsteinpflasterrelief in der Kulturschale bildeten, zeigte sich in der Kultur der mit metabolisiertem Thalidomid behandelten Zellen ein grundlegend anderes Bild (Abb 15). Die Zellen waren deutlich in Ihrer Anzahl vermindert (siehe PDT und PDL). Sie lagerten sich nicht zu konfluierenden Gruppen aneinander und wiesen Atypien in der Zellmorphologie auf. Sie hatten die

Fähigkeit zur Adhärenz teilweise verloren und bildeten nicht die für Endothelzellkulturen typischen Zellverbände. Die Zellen der Gruppen 2 und 4 zeigten das Gleiche Konfluenzverhalten wie die Zellen der FCS-Gruppe (nicht abgebildet).

Zusammenfassend führte die Behandlung von Kaninchenendothelzellen in-vitro mit metabolisiertem Thalidomid über 12 Tage zu einer reduzierten Proliferationsrate, einer verlängerten Verdoppelungszeit sowie einer verlängerten Proliferationszeit im



Abbildung 15: Irregulär konfigurierte Kaninchenendothelzellen nach 12 tägiger Kultivierung unter Zusatz von metabolisiertem Thalidomid. Erkennbar die Zellkernatypien, fehlendes Kopfsteinpasterrelief und irreguläre Zellmorphologie (200 fache Vergrößerung Lichtmikroskop).

Vergleich zu einer mit FCS behandelten Kaninchenendothelzellkultur. Die Gabe von normalem Kaninchenserum sowie von reinem Thalidomid hatte keinen signifikanten Einfluß auf das Proliferationsverhalten, die Verdopplungsanzahl der Zellgenerationen sowie auf die Verdopplungszeit.

Zellen, die vom 1. bis zum 6. Tag mit metabolisiertem Thalidomid behandelt wurden und dann weiter mit FCS inkubiert wurden, zeigten wieder eine ansteigende Proliferationsrate. Die Zellzahlen stiegen von 16500 (Range 13800-18000) Zellen auf 185000 Zellen (Range 175300-198650). Sie wiesen nach 15 Tagen (also 9 Tage nach dem Umsteigen von metabolisiertem Thalidomid auf FCS wieder ein endothelzelltypisches Konfluenzmuster mit Kopfsteinpflasterrelief auf.

4.3. Diskussion

Eine Studie der Literatur zeigt unterschiedliche Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen zur Aktivität von Thalidomid auf Endothelzellen in-vitro. Während D'Amato et al. keinen Unterschied der Endothelzellproliferation im Chorionallantois-Modell sahen, konnten Moreira und Mitarbeiter sowohl für Thalidomid als auch für ein Struktur analogon eine in-vitro Hemmung der Endothelzellproliferation beweisen {64,130,132}. Bauer und Mitarbeiter berichteten über die Notwendigkeit der metabolischen Aktivierung von Thalidomid zur Entfaltung antiangiogenetischer Eigenschaften {129}. Nach den überzeugenden Arbeiten dieser Arbeitsgruppe kann als gesichert gelten, daß das Medikament nur in Tierversuchen verlässlich eingesetzt werden kann, wenn diese Tiere den Wirkstoff auch metabolisieren können {129}. Dieses ist lediglich bei Tieren die entwicklungsgeschichtlich höher entwickelt sind als Mäuse oder Ratten der Fall. Obwohl in den letzten 30 Jahren mehr als dreissig Hypothesen über den Wirkungsmechanismus von Thalidomid veröffentlicht wurden, hat sich bisher keine Hypothese als bewiesen durchgesetzt. Es ist ebenso bis heute ungeklärt welcher der Metabolite des Thalidomid für die teratogene Wirkung des Medikaments verantwortlich ist. Nach oraler Aufnahme kann die Hydroxylierung der Substanz an zwei Stellen im Glutaramid und im Phtalimidring erfolgen und so zur Bildung von 5 primären Metaboliten führen. (4-OH-thalidomid, 3-OH-thalidomid, 3`-OH-thalidomid, 4`-OH-thalidomid, 5`-OH-thalidomid). Diese hydroxylierten Metaboliten konnten sämtlich im Kaninchenmodell nach oraler Gabe von Thalidomid im Serum identifiziert werden {131}. Das Kaninchen ist für die teratogene Wirkung von Thalidomid sensibel. Der weitere Abbau von Thalidomid führt zu intermediären Zwischenprodukten wie zB. Arenen und Epoxiden, die von verschiedenen Autoren als ursächlich für die

teratogene Wirkung der Substanz angesehen wurden {133,134,135}. Jedoch konnten Arene und Epoxidverbindungen im Kaninchenserum nach oraler Administration von Thalidomid bisher nicht nachgewiesen werden {134}.

Neben der antiangiogenetischen Wirkung von Thalidomid wurden Wirkungen des Medikaments auf zelluläre und immunologische Funktionen des Organismus beschrieben. Stephens und Mitarbeiter bewiesen einen inhibitorischen Effekt von Thalidomid auf die Förderung der $\alpha\upsilon\beta_3$ Integrin Expression durch Insulin-like growth factor I (IGF-I) und Fibroblast growth factor II (FGF-II) {135}.

Endothelzellen sind Zielorgan von Thalidomidmetaboliten. Bereits 1960 berichteten Miller et al. über eine Veränderung der vaskulären Permeabilität durch Thalidomid in einem Kleintiermodell {133}. Nogueira und Mitarbeiter sahen eine Reduktion der Expression von ICAM-1 von mit TNF- α oder IL1- β stimulierten HUVEC-Zellen nach der Inkubation und Thalidomid {134}. Die Formationsanomalien der in-vitro

Endothelzellkulturen sowie die beobachteten Zellatypien mit einer reduzierten Gesamtanzahl an Endothelzellen in-vitro könnten sich klinisch in einer verminderten Angiogenese, sowie Gefäßmalformationen und konsekutiven Organmissbildungen - wie sie unter der Einnahme von Thalidomid durch schwangere Frauen bei der Thalidomidembryopathie beschrieben wurden – widerspiegeln.

Die dargestellten Untersuchungsergebnisse zeigen erstmals eine direkte inhibitorische Wirkung von metabolisiertem Thalidomid auf die Proliferationsrate von Kaninchenendothelzellen in vitro. Diese Wirkung von Thalidomid konnte bisher weder in-vitro bei Endothelzellen anderer Spezies noch in-vivo nachgewiesen werden. Die herabgesetzte $\alpha\upsilon\beta_3$ Integrinexpression auf Endothelzellen nach der Inkubation mit metabolisiertem Thalidomid könnte eine der Ursachen für das gestörte

Anlagerungsverhalten der untersuchten Zellen in den eigenen in-vitro Versuchen sein {135}. Eine andere Erklärung für die reduzierte Proliferationsrate könnte in dem von Parman und Mitarbeitern 1999 beschriebenen Effekt begründet sein, daß ein Metabolit des Thalidomid zu einer Oxydierung der Endothelzell-DNA an Position 8 der DNA zu einer erleichterten Intercalation von Thalidomid an dieser Stelle führen könnte {136}.

Die Ergebnisse der Studie zeigen erstmalig einen direkten inhibitorischen Effekt von metabolisiertem Thalidomid auf die Proliferationsrate von Kaninchenendothelzellen. Sollte sich dieser Effekt potentiell auch auf Tumorendothelzellen übertragen lassen, scheint eine Anwendung von Thalidomid als Angiogenesehemmer möglich und auch in-vivo vorstellbar. Die Effekte des Medikaments müssen jedoch nicht nur an Endothelzellen untersucht werden, sondern auch im Hinblick auf etablierte Therapieformen überprüft werden.

So muß zB vor der intraoperativen, intraperitonealen Anwendung von Thalidomid nach chirurgischer Intervention im Gastrointestinaltrakt eine Gefährdung des Operationsergebnisses ausgeschlossen werden. Keinesfalls darf die Morbidität oder Mortalität nach kolorektalen Resektionen durch die additive Gabe von intraperitonealem Thalidomid erhöht werden, da dies auch durch einen eventuellen antiangiogene-netischen Benefit nicht zu rechtfertigen wäre. Somit sollte in den folgenden Untersuchungen der Effekt von intraperitoneal appliziertem Thalidomid unmittelbar nach Anlage einer Dickdarmanastomose im Kaninchentiermodell überprüft werden. Vorher wird auf für die Angiogene-nese der Anastomosenheilung wichtige Grundlagen eingegangen.

5. Grundlagen der Anastomosenheilung

Die ungestörte Anastomosenheilung am Intestinum folgt normalerweise einem regelhaften Ablauf. Sie ist die Grundvoraussetzung für einen komplikationslosen postoperativen Verlauf nach abdominalen Eingriffen, die mit einer Dünn-, oder Dickdarmresektion einhergehen. Eine ausreichende Durchblutung, sowie die spannungsfreie, primär gas- und flüssigkeitsdichte Adaptation der Wundränder bilden die wichtigsten Voraussetzungen für eine ungestörte Heilung der Darmwandnaht {138,139}. (Tab. 13). Die Anastomosenheilung erfolgt in ähnlicher Weise wie die

Voraussetzungen für eine komplikationslose Wundheilung

- Gute Durchblutung der zu anastomosierenden Enden
- Vermeidung von Spannung
- Antibiotikaprophylaxe
- Präoperative Darmreinigung (Stuhlbeseitigung, Keimreduktion)
- gas- und flüssigkeitsdichte Darmnaht
- gesunder Darm
- geringe Gewebetraumatisierung
- gründliche Blutstillung
- gleichmässige Approximation der zu anastomosierenden Enden durch die Naht unter Mitnahme der Submukosa

Tabelle 13: Voraussetzungen einer ungestörten Heilung von Darmanastomosen.

Wundheilung in anderen Bereichen des menschlichen Organismus {140,141,142,143,144,145}. Die Wundheilung ist auch hier nichts anderes als eine entzündliche Reaktion des Organismus auf ein geplantes Trauma (Darmresektion) und setzt sich aus den verschiedenen Phasen Exsudation, Proliferation und Reparation zusammen {146}. Die Blutversorgung einer Anastomose ist abhängig von der Formation neuer Blutgefäße in der angelegten Anastomose. Die Wiederherstellung der vaskulären Architektur in der Anastomose beginnt ca 48-72h nach Anlage der Darmwandnaht {21,22}. Nach erfolgter Degradation der Basalmembran und Proliferation der

Endothelzellen entstehen zunächst primitive tubuläre Strukturen in der Anastomosenregion, die dann schrittweise zu neuen Kapillaren in der Anastomose umgebaut werden. Durch Fibroblasten und die Endothelzellen selbst synthetisiertes und sezerniertes Fibronectin dient als verbindendes Agens für die Migration der Endothelzellen in die Anastomose {23}. Dieser Prozess beginnt 2-3 Tage nach dem chirurgischen Trauma, und die Anzahl der einsprossenden Gefäße nimmt bis zum 7. postoperativen Tag beständig zu.

Aus den oben beschriebenen Mechanismen leitet sich ab, daß die intraperitoneale Administration von Angiogeneinhibitoren wie z.B. Thalidomid unmittelbar nach der Anlage einer gastrointestinalen Anastomose mit der Heilung der Darmwandanteile interferieren, und dadurch zu einer Zunahme der postoperativen Morbidität und Mortalität führen könnte.

Die einzelnen Schichten der Darmwand besitzen für die Heilung von Anastomosen unterschiedliche Bedeutung. Die Submukosa ist die kräftigste Schicht der Darmwand und enthält reichlich fibrilläre kollagene Fasern des Typ I und III {140,141,147}.

Die für die frühe Phase der Anastomosenheilung wichtige arteriovenöse Gefäßarchitektur folgt am gesamten Intestinaltrakt einem einheitlichen Muster {148}. Dabei wird nach mikroangiographischen Studien von Spjut et al. sowie Abramovitz et al. der arterielle in der Submukosa verlaufende Plexus aus den mesenterialen Vasa recta stammenden Vasa longa et brevia gespeist {148,149}. Die Arteriolen schlängeln sich zwischen den kollagenen und elastischen Fasern hindurch und zweigen Plexus zur Lamina propria mucosae, der Muskularis und Subserosa ab. Die mit den Arterien verlaufenden Venen, Venolen und Lymphgefäße haben ein ähnliches intramurales Verteilungsmuster {140,148,149}.

Die Voraussetzungen für eine Wundheilung nach Darmreanastomosierung sind nicht an allen Darmabschnitten identisch, sondern an Dünndarm und Dickdarm unterschiedlich. Der Dünndarm hat ein starkes Bindegewebsskelett und eine starke Muskelwand mit erheblicher Kollagenbildung nach Wundsetzung {140,150,151}. Die Blutversorgung ist zum Teil über mehrstöckige Gefäßarkaden kräftig ausgebildet. Der operierte Dünndarm nimmt frühzeitig seine Peristaltik wieder auf und der flüssige bis breiige verhältnismäßig keimarme Darminhalt wird durch die polare Muskelarchitektur von kranial nach kaudal transportiert. Im Gegensatz dazu hat das Kolon die dünnste Wand im Magen-Darm-Kanal, unterhalb der peritonealen Umschlagfalte fehlt im Kolon der für die Heilung wichtige Serosaüberzug {152}. Die Muskulatur und das Bindegewebe sind schütter und ungleichmäßig verteilt. Die Kollagenproduktion ist nach Trauma geringer {151,152}. Die Blutversorgung ist deutlich zarter und variabel segmental auf eine einzige Randarkade konzentriert. Die Kollateralisation ist daher deutlich geringer als am Dünndarm oder Magen. Die Volumenschwankungen sind erheblich und durch die apolare Muskelarchitektur pendelt der Inhalt hin und her bevor er weitergeschoben wird. Darüberhinaus ist der Darminhalt hochgradig durch Bakterien beladen. Im Vergleich zum Magen oder Dünndarm mit relativ geringer Bakterienzahl betragen Bakterien ca 10% des Trockengewichts des Dickdarms {140,153}. Aufgrund dieser unterschiedlichen Gegebenheiten läuft die Wundheilung zwar prinzipiell an Dün- und Dickdarm ähnlich ab, jedoch ist die Heilung von Kolonanastomosen anfälliger für Störungen im Vergleich zu Dünndarm- oder Magenastomosen.

Auf die Einzelheiten des weiteren Ablaufs der Anastomosenheilung soll nun im Besonderen in Bezug auf die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und die

Revaskularisierung der Darmanastomose eingegangen werden. Unmittelbar nach Anlage der Darmnaht kommt es im Bereich der Schnittflächen zu einem entzündlichen Ödem mit anschwellen der Endothelien, Basalmembranen und Perizyten der Kapillaren. Das Ödem geht mit einer Thrombozytenaggregation und der Aktivierung des Gerinnungssystems einher. Es kommt zur Ausschüttung von Zytokinen (PDGF, EGF, VEGF, Thromboxan, TGF- α und TGF- β , u. a.) aus Thrombozyten und einwandernden Makrophagen {154,155,156,157,158,159}. Die Wundheilung wird durch eine Reihe zellulärer Interaktionen zwischen inflammatorischen Zellen beeinflusst, die durch die Verletzung angezogen werden. Zusätzlich scheint das azidotische, hyperlaktämische Wundmilieu mit einem erniedrigten Sauerstoffpartialdruck und einer daraus resultierenden hypoxischen Stoffwechsellage eine entscheidende Rolle für die Sekretion von angiogenen und mitogenen Zytokinen zu spielen {153,155,156,158,159}. Möglicherweise erfolgt die Steuerung der Zytokinsekretion der Makrophagen über die Veränderung des Sauerstoffpartialdrucks {158,159}. Besondere Bedeutung für die Reorganisation und Remodellierung des durch die Wunde betroffenen Gewebes haben die Endothelzellaktivierung und die Angiogeneese, die eng abgestimmt mit der Fibroblastenaktivierung verlaufen. Nach angiographischen Untersuchungen beginnt die Gefäßneubildung bereits 48h nach der Anastomosennaht {148,160,161,162}. Die Gefäßneubildung unterliegt der Regulation verschiedener Wachstumsfaktoren (VEGF, PDGF, TGF, bFGF, EGF u.a.) {163,164,165}. Es kommt zur Proliferation von Endothelzellen und Perizyten, die in der Bildung von Gefäßknospen und der Entstehung von neuen Kapillarlichtungen resultiert {163,164,165}. Wie bereits in der Einleitung der Arbeit beschrieben läuft die Angiogeneese in mehreren Teilschritten ab.

Angeregt durch Zytokine wie beispielsweise das VEGF kommt es zu einer durchlässigen Basalmembran der Endothelien, so daß die Endothelzellen aus benachbarten Kapillaren sich an zytoplasmatischen Pseudopodien durch die fragmentierte Basalmembran in Richtung der Wunde bewegen können. Wahrscheinlich spielen Adhäsionsmoleküle wie Fibronectin, $\alpha\beta$ -3 Integrin und weitere Integrine eine entscheidende Rolle bei diesen Vorgängen, jedoch sind die Einzelheiten der Steuerung dieses hochdifferenzierten Beginns des endothelialen Reparationsvorgangs letztendlich nicht geklärt.

Die Hemmung der Integrinexpression sowie der Zytokinexpression VEGF, TNF-alpha und PDGF durch Thalidomid, sowie die Proliferationshemmung der Endothelzellen könnte zu einer nachhaltig gestörten Gefäßbildung in der Anastomose, und dadurch zu einer erhöhten Rate an Anastomoseninsuffizienzen nach Kolonanastomosen führen. Daher ist es unerlässlich den Einfluß von intraperitoneal appliziertem Thalidomid auf die Anastomosenheilung vor dem klinischen Einsatz im Tiermodell zu überprüfen. In einer geblindeten Studie an 40 New Zealand White Kaninchen wurde die Wirkung von intraperitoneal appliziertem Thalidomid auf die Heilung einer Dickdarm Anastomose im Tiermodell überprüft. Das Hauptzielkriterium war der Berstungsdruck der Anastomose. Nebenzielkriterien waren der Angiogenesescore, die Expression von Mib- 1 sowie die TNF-alpha Veränderungen im Serum der untersuchten Tiere.

6. Prospektiv randomisierte Studie zur Untersuchung des Einfluß von i.p. appliziertem Thalidomid auf die Heilung von Kolonanastomosen im Kaninchentiermodell

6.1. Material und Methoden

Nach erteilter Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheitsschutz und technische Sicherheit des Senats von Berlin für das Protokoll Nr. Reg 0201/00 wurden 40 New Zealand White Kaninchen (Charles River Wiga Ansbach, Deutschland) mit einem Gewicht von 2.5 bis 3 kg in der Tierexperimentellen Abteilung der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Campus Mitte unter Standardbedingungen gehalten. Nach einer Akkomodationszeit von einer Woche wurden die Tiere mit einer Ketanest Rompun Narkose betäubt (im. Injektion von Ketaminhydrochlorid (50 mg/kg Hoechst AG, Frankfurt/Main, Deutschland und Rompun 5 mg/kg Bernburg AG, Bernburg, Deutschland).

6.1.1. Operationsablauf

In Rückenlage wurden die Tiere mit Betaisodona desinfiziert und steril abgedeckt. Danach wurden die Kaninchen über eine 5cm lange Mittellinieninzision laparotomiert. Daraufhin wurde das Zökum mobilisiert und das Mesenterium auf einer Länge von 2 cm disseziert. Danach erfolgte die Resektion von 2cm des Zökums mit anschließender Reanastomosierung durch eine fortlaufende 2-reihige Naht mit 5/0 PDS (Ethicon®, Norderstedt, Deutschland) in End-zu-End Technik. Danach wurde erneut eine Peritonealbiopsie entnommen. Vor dem Laparotomieverschluß wurden die Tiere in 4 Gruppen á 10 Tiere randomisiert. Gruppe 1 (n=10) und Gruppe 2 (n=10) wurden durch

intraperitoneale (i.p.) Injektion von 200mg/kg Thalidomid (Grünenthal AG, Aachen, Deutschland) gelöst in 10ml Carboxymethylzellulose (CMZ, Grünenthal AG, Aachen, Deutschland) behandelt. Gruppe 3 (n=10) und 4 (n=10) wurden mit 10ml CMZ ip. therapiert. Die Gabe der Versuchsmedikation erfolgte geblendet durch den Operateur ohne Kenntnis der Randomisierungszugehörigkeit des jeweiligen Tieres. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 16 schematisch dargestellt.

6.1.2. Dosierung von Thalidomid

Die Dosierung von Thalidomid wurde in vorangegangenen tierexperimentellen Studien unterschiedlich gewählt. Geist und Mitarbeiter untersuchten in einem Tiermodell den Einfluß von Thalidomid auf die Schwartzman-Sanarelli-Reaktion bei New Zealand White Kaninchen. Hier wurden Serumspiegel von Thalidomidmetaboliten nach ip. Applikationen unterschiedlicher Thalidomidmengen von 50, 100, 200 und 400 mg/kg KG gemessen {59}. Sie fanden wirksame Spiegel nach der Applikation von mindestens 187 mg/kg KG ip. In einer Studie an C57 / B16 Mäusen sahen Minchington und Mitarbeiter keinen tumorhemmenden Effekt nach ip. Applikation von 10 mg/kg KG {82}. Allerdings wurden keine systemischen Spiegel im Blut gemessen. Darüberhinaus sahen Gutman et al. nach oraler Administration von 0,3 – 2 mg/kg KG keinen tumorhemmenden Effekt auf das Wachstum von C26 Kolonkarzinomzellen im Mausmodell {80}. Dieses negative Resultat könnte durch die speziesspezifischen Metabolisierungsunterschiede der Substanz bedingt sein, die durch Studien von Stephens sowie Bauer et al. bekannt geworden sind {129,131}. Diese Untersucher konnten zeigen, daß Thalidomid bei schwangeren Mäusen nach oraler Administration keine teratogenen Mißbildungen hervorruft, jedoch die i.p. Administration zu ähnlichen Mißbildungen wie bei Menschen

führt. Nach den zitierten Untersuchungen wurde eine Dosierung von 200 mg/kg KG als ausreichend angesehen, um den Effekt von i.p. appliziertem Thalidomid auf die Heilung von Darmanastomosen im Kaninchentiermodell zu untersuchen.

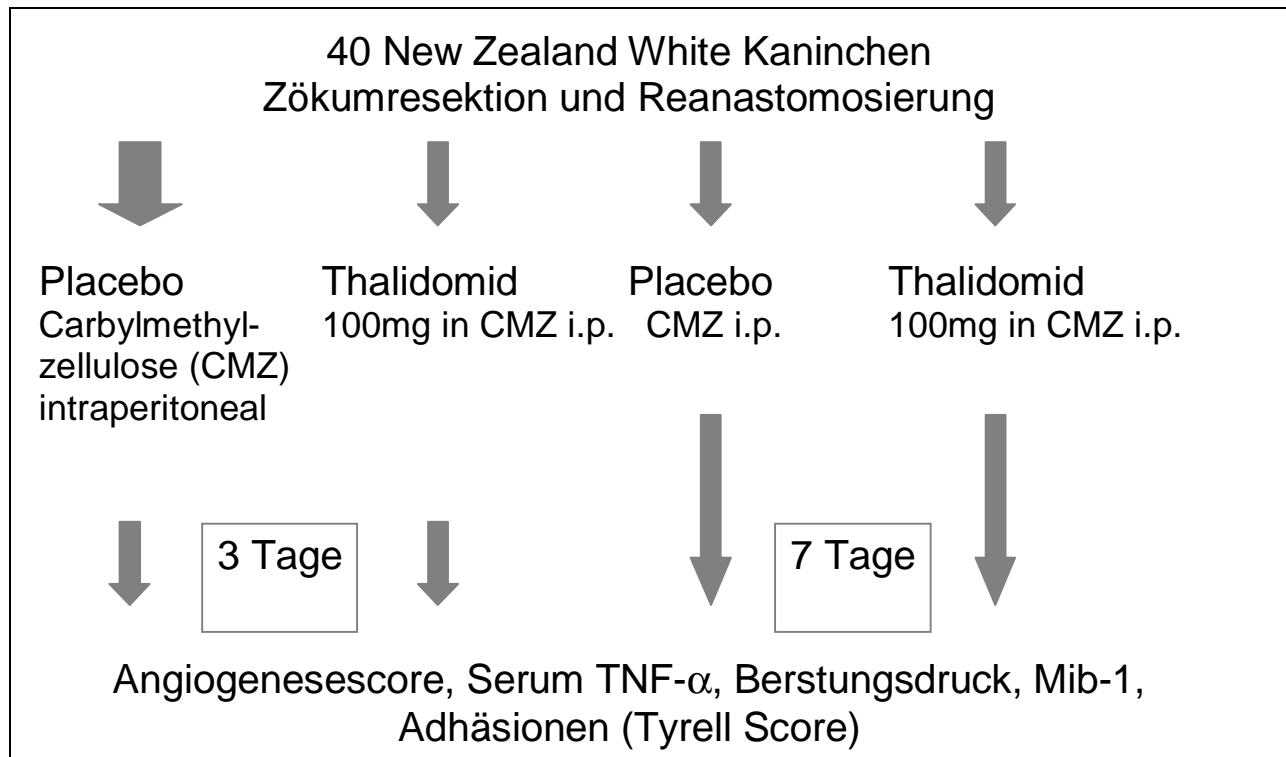


Abbildung 16: Versuchsaufbau zur Untersuchung der intraperitonealen Wirkung von Thalidomid nach Zökumresektion im Kaninchenmodell.

Das Abdomen wurde durch forlaufende PDS 2/0 Fasziennaht und 4/0 Vicryl Subkutannaht sowie Einzelknopfnähte mit Ethibond 4/0 (Ethicon®, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Das tägliche Monitoring der Tiere beinhaltete die Überprüfung des Aktivitätsstatus der Tiere, die Messung der Körpertemperatur und des Gewichts sowie die Überwachung des Fressverhalten der Tiere. Eine Blutentnahme zur Bestimmung des Blutbildes allen Tieren wurde vor Beginn der Operation, bei den

Gruppen 1 und 3 am 3. postoperativen Tag und bei den Gruppen 2 und 4 am 7. postoperativen Tag durchgeführt.

Am 3. postoperativen Tag wurden die Tiere der Gruppen 1 und 3 erneut in der oben beschriebenen Weise narkotisiert und laparotomiert. Danach wurde das Abdomen auf das Vorliegen einer Peritonitis oder einer lokalen Entzündungsreaktion um die Anastomose als Ausdruck einer gedeckten Insuffizienz klinisch von 2 unabhängigen, geblindeten Untersuchern (Dr. Mall und Dr. Pollmann, beide Mitarbeiter der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Campus Mitte) untersucht. Die Ausprägung von Adhäsionen wurde ebenfalls von beiden Untersuchern nach der von Tyrell et al. beschriebenen Methode durchgeführt {235}. Danach wurde das Zökum komplett mobilisiert und ein 10 cm langer Teil des Kolon ascendens mit der angelegten Anastomose in der Mitte reseziert. Die Tiere wurden durch intravenöse Injektion mit hypertoner Kaliumchloridgabe schmerzlos getötet.

6.1.3. Untersuchung des Berstungsdrucks

Die Fallzahlschätzung ergab bei einem angenommenen Berstungsdruckunterschied von 25 mmHg eine Anzahl von 10 notwendigen Tieren pro Untersuchungsgruppe. Da ein Unterschied von weniger als 25 mmHg im Berstungsdruck der Anastomose nicht klinisch relevant erschien wurden somit eventuell bestehende Unterschiede von weniger als 25 mmHg in den Berstungsdrücken nicht erfasst. Darüberhinaus zeigte sich, daß als die Fallzahlschätzung mit den erhobenen Werten der Versuchstiere

wiederholt wurde, eine Fallzahl von 9 Tieren pro Gruppe ausreichend gewesen wäre um den gefundenen Unterschied statistisch zu belegen.

Die Messung des Berstungsdruck wurde wie folgt durchgeführt. An einem Ende des Darmresektats wurde ein Füllungskatheter eingeführt und mit einer Tabaksbeutelnaht flüssigkeits- und gasdicht fixiert. Am entgegengesetzten Ende wurde ein Druckabnehmer (arterieller Druckmessungskatheter, Braun Melsungen, B Braun GMBH) in gleicher Weise intraluminal fixiert und mit einem computergestützten Monitorsystem konnektiert (Sirecust, Siemens München). Mit Hilfe dieses Systems ist eine kontinuierliche Messung der Änderung der intraluminalen Druckverhältnisse möglich. Es werden alle 0,5 sec Messungen durchgeführt, die online sowohl graphisch als auch numerisch erfasst werden. Das Darmresektat wurde zunächst mit 50ml Ringerlösung (Baxter, Deutschland) manuell vorgefüllt. Danach wurde eine Rollerpumpe angeschlossen, über die eine kontinuierliche Infusion von 50ml/10min durchgeführt wurde. Bei steigenden Druckwerten intraluminal wurde die Berstungsstelle des Darms als in der Anastomose, anastomosennah oder anastomosenfern klassifiziert. Nach der Erfassung des Berstungsdrucks wurde die Anastomose aus dem Kolonresektat herausgelöst und in Formalin fixiert. In gleicher Weise erfolgte die Untersuchung der Tiere der Gruppen 2 und 4 am 7. Postoperativen Tag.

6.1.4. Immunhistochemische Aufarbeitung der Anastomosenpräparate

Die Weiterverarbeitung der Anastomosenpräparate wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité, Campus Mitte, (Direktor: Prof. Dr. med. M. Dietel) durchgeführt. Die immunhistochemische Aufarbeitung der Präparate erfolgte nach der von Myers et al. 1995 beschriebenen capillary-gap Technik {10}. Hierzu wurden die in Formalin fixierten Anastomosenpräparate zunächst zugeschnitten und Paraffin-Blöcke erstellt. Die pathologischen Präparate wurden in 4 µm Schnitten mit dem Mikrotom zugeschnitten. Die Aufarbeitung der Präparate wurde nach der Streptavidin-Biotin Methode durchgeführt. Nach Erwärmung der Präparate auf dem Objektträger über 24 Stunden bei 60° C im Inkubator erfolgte die Deparaffinisierung in Xylen sowie die Rehydrierung. Durch Hinzugabe von Zitratpuffer wurde die Hitze-induzierte-Epitopdarstellung vervollständigt. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Objektträger in Proteinase K Enzymlösung (1:40) in Tris-Puffer über 10 Minuten bei Raumtemperatur (Dako, Hamburg, Deutschland). Nach einer 5minütigen Inkubation mit Ziegen Serum (BioTek Solutions, Santa Barbara; CA, USA) erfolgte dann die Hinzugabe des primären Antikörpers für 25 Minuten bei Raumtemperatur. Die verwendeten Antikörper waren der CD 31 polyklonale Antikörper (Verdünnung 1:800, Dako, Hamburg, Deutschland) sowie der anti Mib-1 monoklonalen Antikörper (Verdünnung 1:100, Dako, Hamburg, Deutschland). Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem sekundären biotynilierten Antikörper über ebenfalls 25 Minuten. Nach Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität mit 3% H₂O₂ (3x2,5 Minuten) wurde Avidin-Biotin-Merrettich-Peroxidase über 25 Minuten hinzugegeben. Die Farbdarstellung der Präparate erfolgte durch dreifache 5-minütige Färbung mit Di-Amino-Benzidin und Gegenfärbung mit Hämatoxylin über 1

Minute. Der Dehydrierung mit graduierten Alkohollösungen folgte dann das Auswaschen mit Xylen und die Deckung mit Deckgläschen. Positiv- und Negativkontrollen wurden bei allen Färbungen zur Überprüfung der Methode mitgeführt. Der Angiogenesescore (AS) wurde nach der von Saclarides et al. beschriebenen Methode ermittelt {18}. Hierbei erfolgte die mikroskopische Untersuchung der gefärbten Schnitte durch zwei unabhängige, geblindete Untersucher. In jedem Präparat wurden unter 200facher Vergrößerung sechs Felder in einem Quadratzentimeter ausgezählt. Zwei Felder lagen im Tumorzentrum und vier in der Peripherie des Tumors. Die Anzahl der Gefäße in jedem Feld wurde addiert und der Mittelwert gebildet. Um einen AS-Referenzwert zu ermitteln wurden 10 Kaninchendarmpräparate in gleicher Weise verarbeitet und untersucht.

Die mit monoklonalen Antikörpern gefärbten Präparate gegen Mib-1 wurden durch dieselben Untersucher analysiert. Unter 200 facher Vergrößerung erfolgte ein Grading der Präparate als visual analog score (VAS) welcher von keiner Färbung (0) über geringe Färbungsintensität (1), intensive (2) bis hin zu maximaler Färbungsintensität (3) variierte.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem SAS 8.0® System für Windows 95® durchgeführt. Die Werte wurden auf Normalverteilung mit Hilfe des Spearman log rank Test überprüft. Desweiteren kamen der zweiseitige t-Test für kontinuierliche Daten und der Mann Whitney U Test bei Gruppenvergleichen zur Anwendung. Parametrische Daten wurden mit Fisher's exact Test ausgewertet. P-Werte kleiner als 0.05 wurden als signifikant angesehen.

6.2. Ergebnisse

Ein Tier der Gruppe 3 (Kontrollgruppe 3. postop. Tag) starb während der Operation aufgrund einer akuten kardialen Dekompensation. Die anderen Operationen verliefen komplikationslos. Keines der Tiere entwickelte septische Temperaturen oder andere klinische Zeichen einer eventuellen Anastomoseninsuffizienz mit Peritonitis während des Beobachtungszeitraums. Alle Tiere begannen noch am Operationstag erneut mit der Nahrungsaufnahme. Der Aktivitätsstatus der Tiere war zwischen den Therapiegruppen und Kontrollgruppen nicht unterschiedlich. Bei zwei Tieren der Kontrollgruppe 3 und drei Tieren der Therapiegruppe 4 traten subkutane Wundheilungsstörungen mit einer partiellen Hautnahtinsuffizienz auf, die jedoch durch eine erneute Hautnaht unter sterilen Bedingungen ausreichend therapiert werden konnten.

6.2.1. Gewicht

Das Gewichtsverhalten der Tiere ist in Abbildung 17 dargestellt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsveränderung zwischen den Gruppen. Bei einem durchschnittlichen Ausgangsgewicht von 1,98 kg (0,18 kg) präoperativ zeigte sich eine Gewichtsreduktion auf einen Mittelwert von 1,84 kg (0,11 kg Standardabweichung) am 3. postop Tag und 1.76 kg (0.21 kg) am 7. postop. Tag.

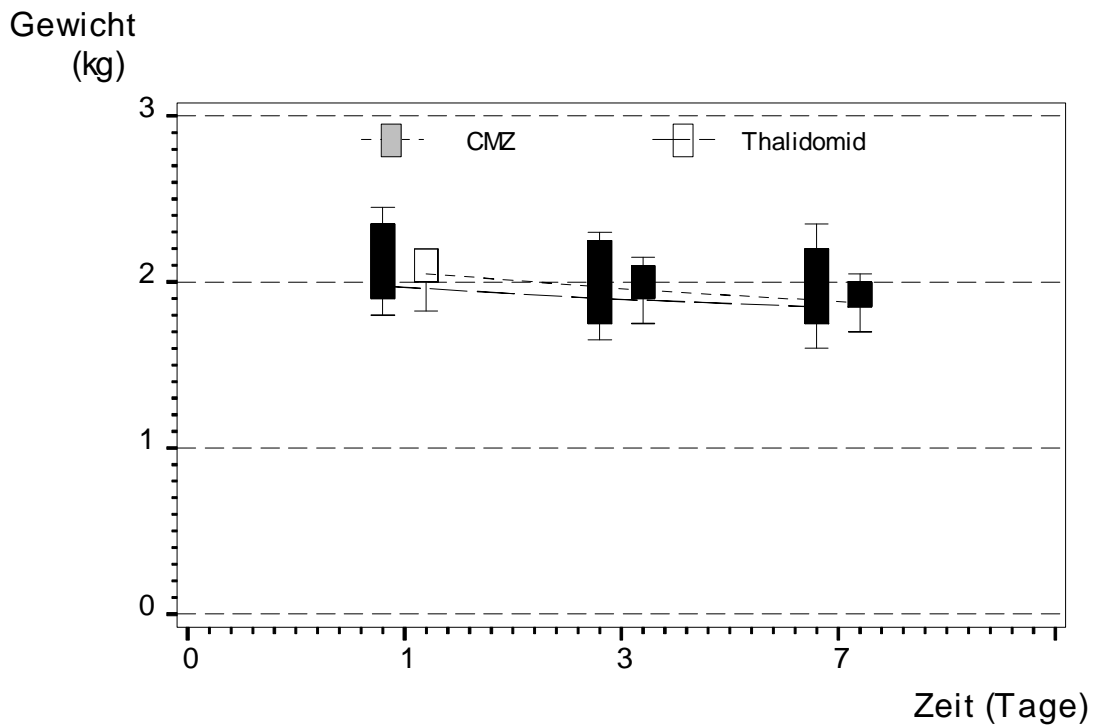


Abbildung 17: Kein signifikanter Unterschied in der Gewichtsveränderung am 3. und 7. postop. Tag bei 40 NZW Kaninchen nach Zökumteilresektion und Reanastomosierung.

Anlässlich der 2. Laparotomie bestand bei keinem Tier am dritten oder siebten postop. Tag Zeichen der Anastomoseninsuffizienz oder einer Peritonitis. Alle Anastomosen waren inspektorisch gut verheilt und ohne Stenosezeichen.

6.2.2. Berstungsdruckmessung

Die Ergebnisse der Berstungsdruckmessungen am 3. und 7. postop. Tag sind in Abbildung 18 dargestellt. Bei den Tieren der Gruppen 1 und 3, die am dritten postop. Tag erneut laparotomiert wurden, lagen die Berstungsdrücke der Anastomosen bei 82.5

mmHG (± 14.6 mmHg), bei den Tieren der Gruppen 2 und 4, die am siebten postop. Tag relaparotomiert wurden, bei 102.8 mmHg (± 21.8 mmHg).

Im direkten Vergleich der Gruppen an beiden Untersuchungszeitpunkten lagen die Berstungsdrücke am 3. postop. Tag in der Thalidomid/CMZ Gruppe (78.8 mmHg (± 11.0 mmHg) etwas höher als in der CMZ Kontrollgruppe (64.7 mmHg (± 17.1 mmHg)). Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

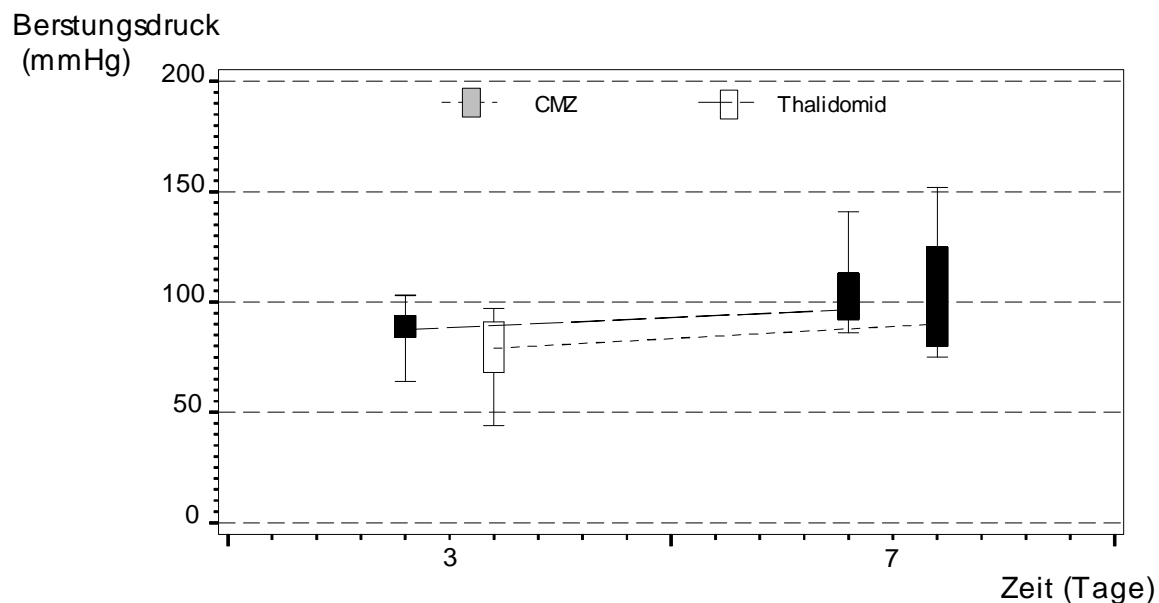


Abbildung 18: Kein signifikanter Berstungsdruckunterschied am 3. und 7. postop. Tag bei 40 NZW Kaninchen nach Anastomosenentnahme ($p > 0,05$).

Am 7. postop. Tag lagen die Berstungsdruckwerte in der CMZ Gruppe (82.61 ± 25.8 mmHg) ebenfalls geringfügig unter denen der Therapiegruppe (91.5 ± 18.1 mmHg). Auch hier war der Unterschied zwischen der Therapie- und der Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant.

Bei 6 Tieren lag die Berstungsstelle nicht direkt in der Anastomosenregion (2 Tiere der Kontrollgruppe 3. postop. Tag; 2 Tiere der Therapiegruppe 7. postop. Tag, und 2 Tiere der Kontrollgruppe 7. postop. Tag,).

6.2.3. Angiogenescore (AS)

Die Gefäßdichte in den untersuchten Anastomosenpräparaten differierte am dritten postoperativen Tag zwischen Kontroll- und Verumgruppe. Während der AS am ersten Untersuchungszeitpunkt in der Thalidomidgruppe bei 29,2 Gefäßen/cm² lag wies die Kontrollgruppe einen AS von 32,6 auf ($p < 0.01$) (Abb 19).

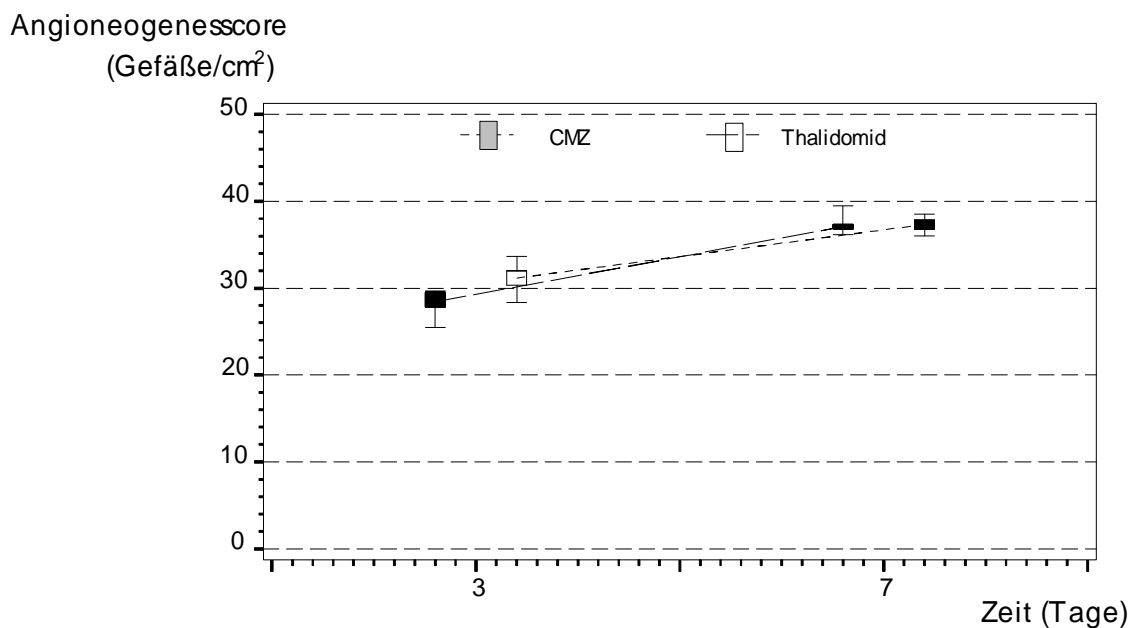


Abbildung 19: Signifikanter Unterschied des Angiogenescore in der Anastomosenregion nach Therapie mit Thalidomid/CMZ oder CMZ allein am 3. postop Tag ($p < 0,01$). Kein signifikanter Unterschied am 7. postop. Tag.

Am siebten Tag waren bei einem Angiogenesescore von 37 (1,8) in der Thalidomidgruppe im Vergleich zu einer Gefäßdichte von 38,1 (2,1) in der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede zu festzustellen ($p < 0,6$) (Abb. 19).

Eine immunhistochemische Darstellung der Gefäße ist in Abbildung 20 dargestellt. Diese Anastomosenregion wurde einem Tier, das mit i.p. Thalidomid behandelt wurde am siebten Tag entnommen.

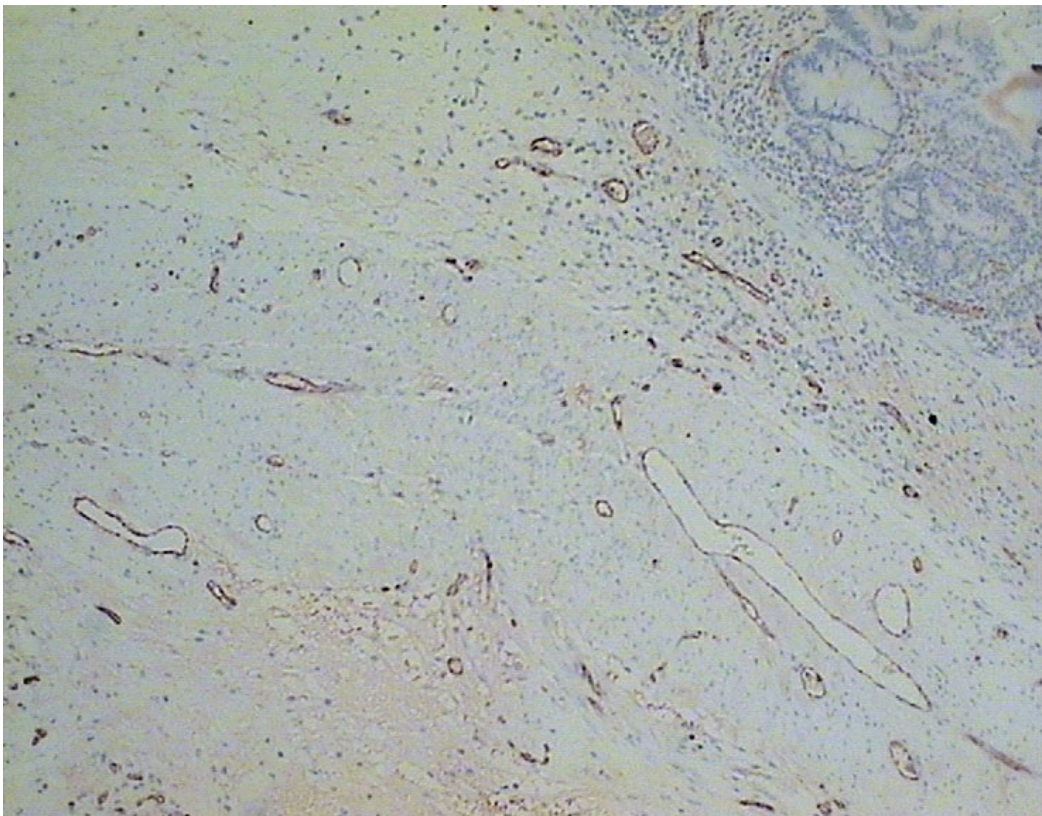


Abbildung 20: Immunhistochemische Darstellung der Gefäße in der Anastomosenregion in der Mukosa und Submukosa nach Thalidomidtherapie am 7. postop. Tag bei NZW Kaninchen (200 fache Vergrößerung, Lichtmikroskopie).

6.2.4. Mib-1 (VAS)

Weder am dritten noch am siebten postop. Tag zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expression des Proliferationsmarkers Mib-1 zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe (Abb. 21). Am dritten Tag lag der visuelle Analogscore (VAS) in der

Anzahl der Tiere

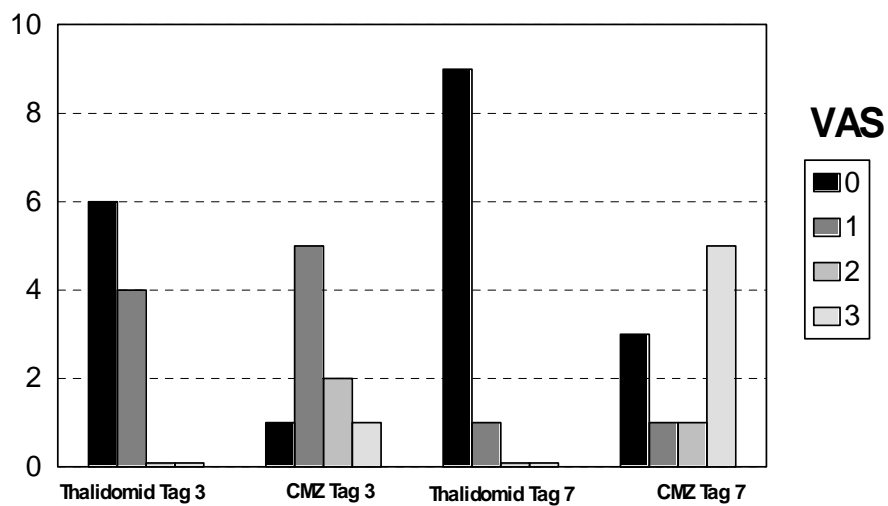


Abbildung 21: Kein signifikanter Unterschied in der Mib-1 Expression (Visueller Analog Score, VAS) in der Anastomosenregion nach Therapie mit Thalidomid/CMZ oder CMZ allein am 3. und 7. postop. Tag bei 40 NZW Kaninchen.

Thalidomidgruppe bei 2.3 im Vergleich zu einem VAS von 2.4 in der Kontrollgruppe. Vergleichbare Ergebnisse waren in der Thalidomid (2.5) und der Kontrollgruppe (2.4) am siebten Tag feststellbar.

6.2.5. Untersuchung der Leukozytenkonzentration im peripheren Blut

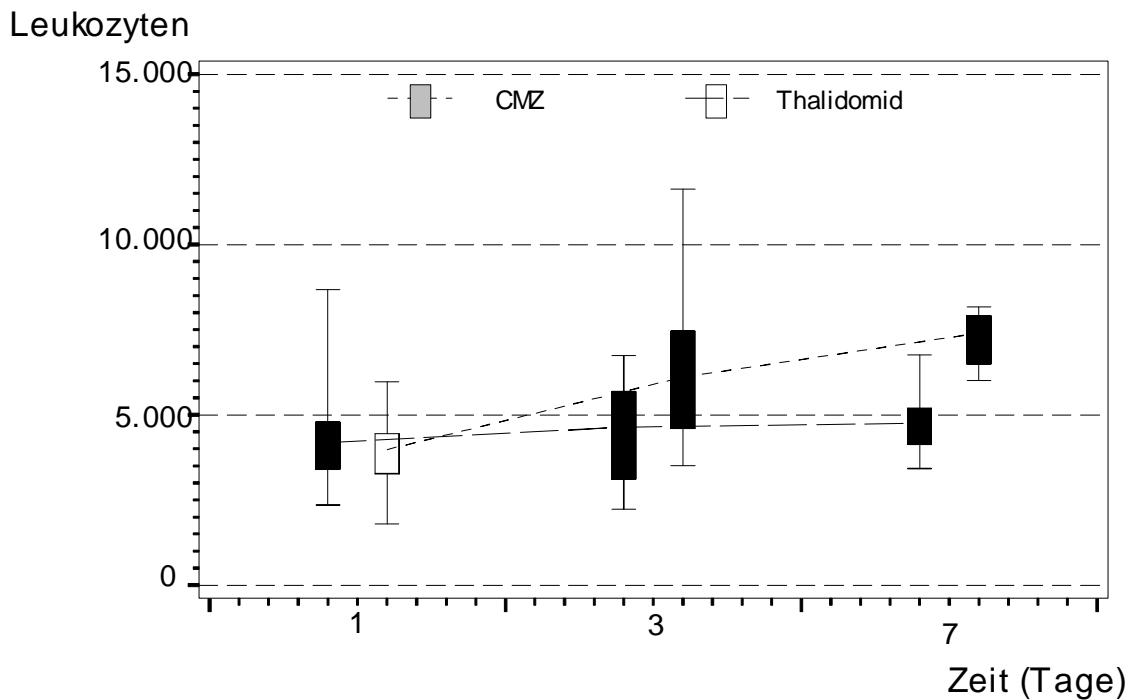


Abbildung 22: Veränderung der Leukozytenkonzentration im Serum nach Therapie mit Thalidomid/CMZ oder CMZ allein am 3. und 7. postop. Tag bei 40 NZW Kaninchen

Die Ergebnisse der Leukozytenveränderung zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten sind Abbildung 22 dargestellt. Während in der Kontrollgruppe die Leukozytenkonzentration am dritten Tag einen Wert von 6498 / ml (SD 204) aufwies war in der Thalidomidgruppe lediglich eine Leukozytenkonzentration von 4327 / ml (SD 128) feststellbar. Dieser Unterschied erreichte das Signifikanzniveau ($p < 0.01$). Der Unterschied war auch am siebten Tag feststellbar. Hier wurden in der

Thalidomidgruppe Werte von 4545 Leukozyten / ml (SD 57) im Vergleich zu 7366 Leukozyten / ml (SD 81) in der Kontrollgruppe gemessen ($p < 0.0001$).

6.2.6. Untersuchung der Hämoglobingehalts

Die Hämoglobinwerte differierten weder am dritten noch am siebten Tag zwischen Kontroll- und Therapiegruppen (Abbildung 23). Nach Datenlage der Literatur war eine Erniedrigung des Hb-Wertes nicht zu erwarten und hätte eher auf eine Komplikation während der Operation (Blutung) als auf einen Einfluß der Studienmedikation zurückgeführt werden müssen.

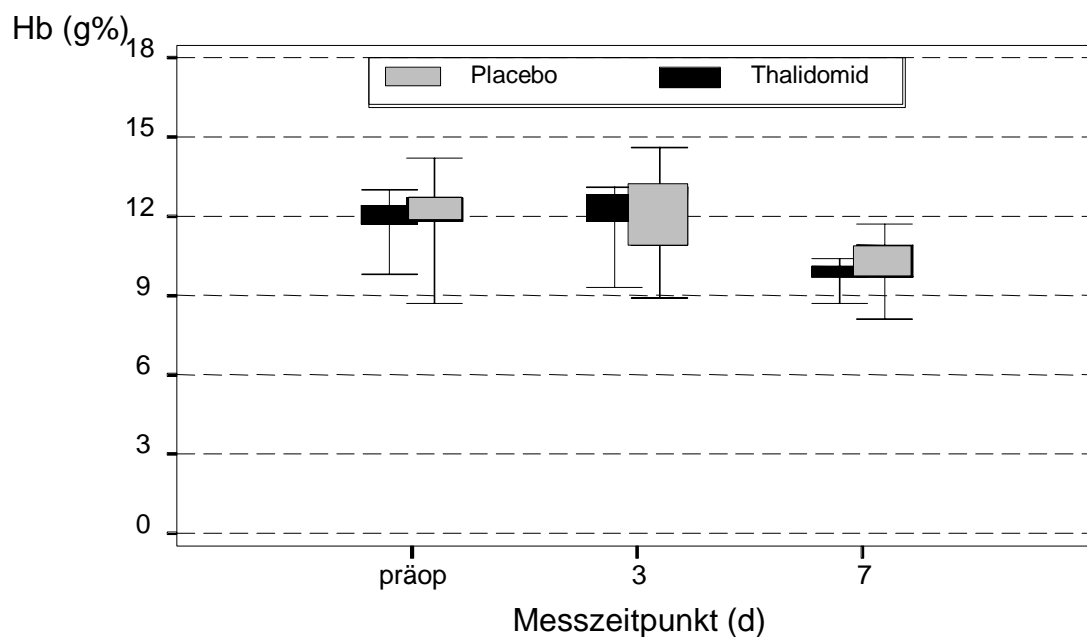


Abbildung 23: Veränderung der Hämoglobinwerte im Serum nach Therapie mit Thalidomid/CMZ oder CMZ allein am 3. und 7. postop. Tag bei 40 NZW Kaninchen. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen am dritten oder siebten Untersuchungstag.

6.2.7 Thrombozyten

Die Thrombozytenzahl wies am dritten postoperativen Tag keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Therapiegruppe auf (Abbildung 24). Am siebten Tag hingegen war die Anzahl der gemessenen Blutplättchen in der Thalidomidgruppe deutlich höher (821200 / ml, SD 89300) als in der Kontrollgruppe (659500 / ml, SD 68500). Dieser Unterschied erreichte das Signifikanzniveau ($p < 0.04$).

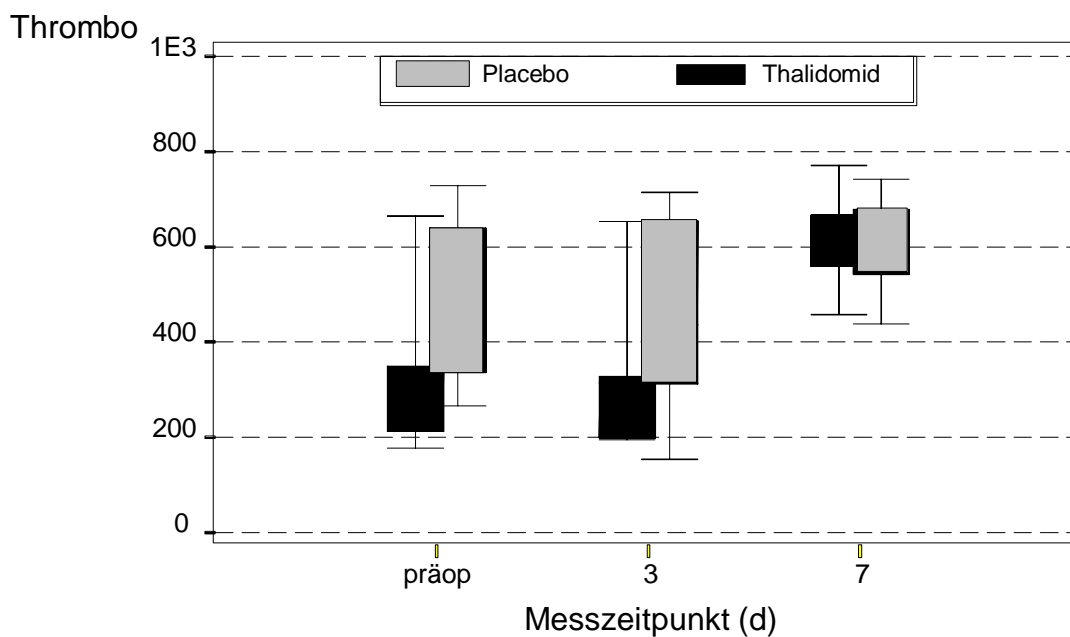


Abbildung 24: Veränderung der Thrombozytenzahlen im Serum nach Therapie mit Thalidomid/CMZ oder CMZ allein am 3. und 7. postop. Tag bei 40 NZW Kaninchen. Die Thrombozyten lagen am 7. Tag in der Thalidomidgruppe signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe.

6.2.8. Adhäsionsscore

Die Unterschiede im Adhäsionsscore zwischen den Gruppen sind in Abbildung 25 dargestellt. Anlässlich der ersten Laparotomie vor Anlage der Kolonanastomose wies keines der Tiere embryonale Verwachsungen oder Verklebungen auf. Nach der Therapie mit Thalidomid war am dritten Tag bei sechs Tieren ein Adhäsionsscore von 0 festzustellen, während vier Tiere mit einem Score von 1 gewertet wurden. Im Vergleich hierzu wies lediglich 1 Tier der Kontrollgruppe des dritten Tages einen Score von 0 auf. Während bei fünf Tieren geringe Verwachsungen festgestellt wurden (Score 1). Während bei fünf Tieren geringe Verwachsungen festgestellt wurden (Score 1).

Anzahl der Tiere

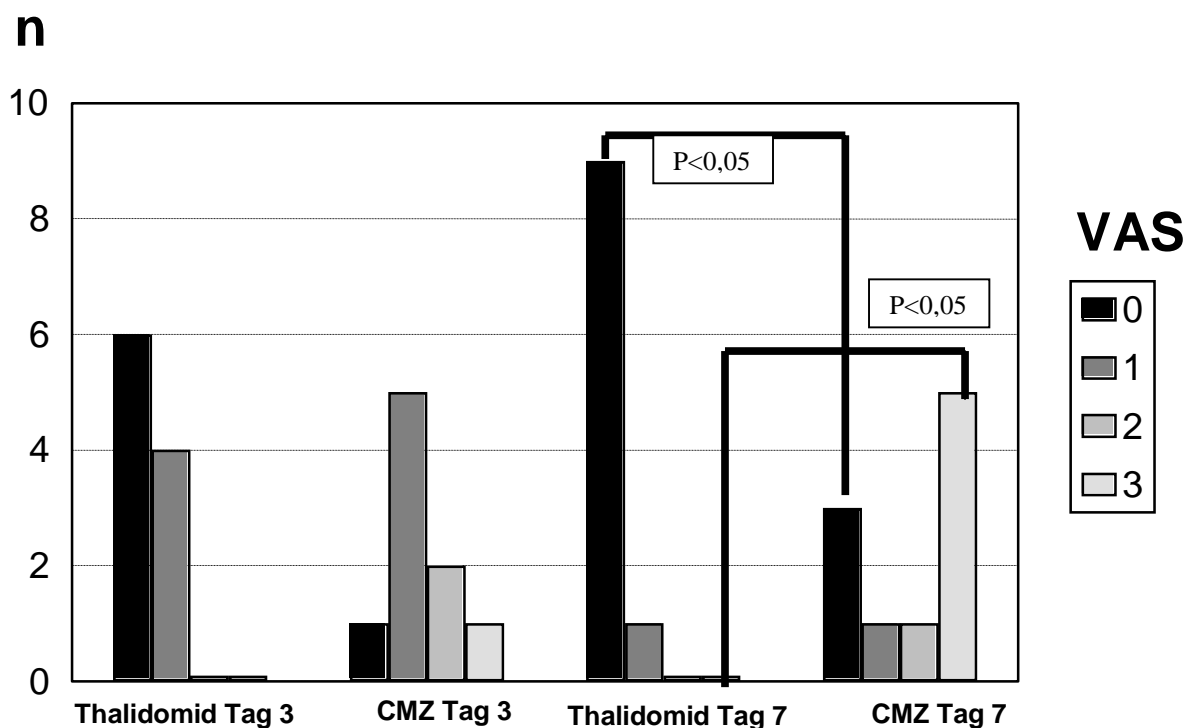


Abbildung 25: Signifikanter Unterschied in der Ausprägung des Adhäsionsscore intraabdominal nach Therapie mit Thalidomid/CMZ oder CMZ allein am 7. postop. Tag zwischen Verum- und Kontrollgruppe ($p < 0,05$) bei 40 NZW Kaninchen

Bei zwei Tieren wurden stärkere Verwachsungen diagnostiziert (Score 2), wohingegen ein Tier stärkste Verwachsungen aufwies. Es konnten nur neun Tiere der Kontrollgruppe ausgewertet werden, da ein Tier während der Operation starb und lediglich als Intention to treat Tier in der statistischen Auswertung der Gruppe verblieb. Am siebten Tag zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der Ausprägung der Verwachsungen zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe. In der Thalidomidgruppe wiesen neun Tiere keine Verwachsungen auf (Score 0) während ein Tier leichte Verwachsungen zeigte (Score 1). In der Kontrollgruppe hingegen waren bei fünf Tieren starke Verwachsungen (Score 3) und bei einem Tier mäßige Adhäsionen zu erkennen (Score 2). Lediglich drei Tiere wiesen keine Adhäsionen auf (Score 0) und ein Tier leichte Verwachsungen (Score 1).

6.2.9. TNF- alpha Konzentration im Serum

Die Bestimmung der TNF-alpha Werte im Serum nach intraperitonealer Verabreichung von Thalidomid zeigten ein einheitliches Bild. Sowohl die Werte am dritten als auch am siebten Tag lagen in der Thalidomidgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p < 0,01$) (Abbildung 26).

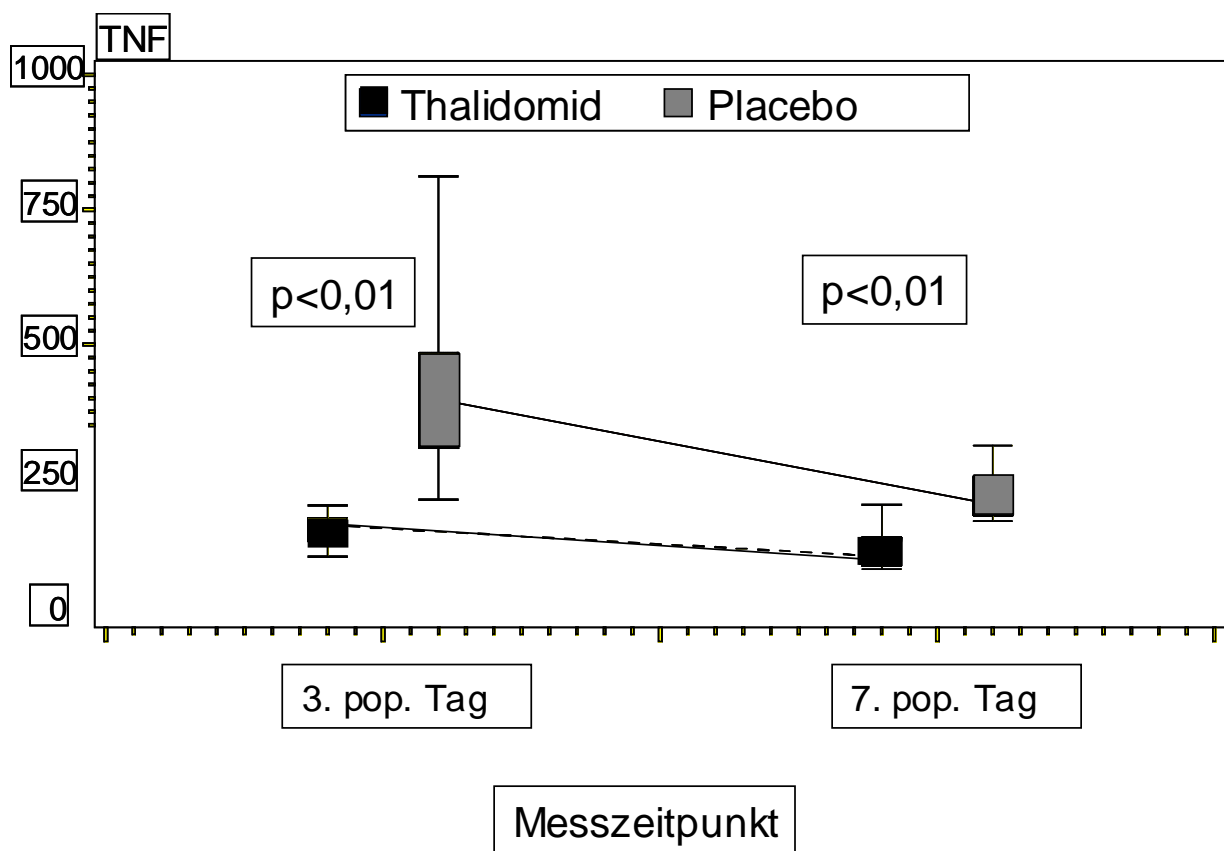


Abbildung 26: Signifikanter Unterschied TNF-alpha Konzentrationen im Serum zwischen Verum- und Kontrollgruppe nach intraperitonealer Therapie mit Thalidomid/CMZ oder CMZ allein sowohl am 3. ($p < 0,01$) als auch am 7. ($p < 0,01$) postop. Tag bei 40 NZW Kaninchen.

6.3. Diskussion

Die Anastomoseninsuffizienz nach der Anlage einer intestinalen Anastomose gehört zu den am meisten gefürchteten Komplikationen nach der Resektion gastrointestinaler Karzinome {16}. Neben bakterieller Kontamination während der Resektion, Malnutrition der operierten Patienten, chirurgischen Operationsfehlern und bestehenden Begleiterkrankungen der Patienten ist eine weitere mögliche Ursache einer Anastomosensuffizienz ein unzureichender Blutfluß im anastomosierten Darmabschnitt {17}. Die Anatomie des Dünndarms bietet aufgrund einer intensiven Durchblutung des Darms, eines hohen Kollagengehalts sowie einer niedrigeren bakteriellen Kontamination im Vergleich zum Dickdarm grundsätzlich gute Voraussetzungen zur Anastomosenheilung {18,19}. Im Gegensatz hierzu zeigt sich im Kolon eine geringere Darmwanddicke, eine höhere bakterielle Besiedelung sowie ein geringerer Gehalt an Kollagen und glatten Muskelzellen. Durch die segmentale Blutversorgung, die in Endarkaden an der Darmwand ausläuft, bestehen schlechtere Durchblutungsverhältnisse verglichen mit dem restlichen Gastrointestinaltrakt. Diese Tatsachen werden als ursächlich für eine höhere Vulnerabilität des Dickdarms angesehen {20}. Das größere Risiko einer auftretenden Anastomoseninsuffizienz am Dickdarm war die Rationale für die Wahl einer Kolonanastomose im hier vorgestellten Kaninchenmodell.

Das Kaninchen ist ein etabliertes Versuchstier um die Effekte intraperitoneal applizierten Thalidomids zu untersuchen {13,14}. Geist und Mitarbeiter sahen bei einer Untersuchung der Effekte intraperitoneal applizierten Thalidomids bei der Schwartzmann-Sanarelli Reaktion an New Zealand White Kaninchen bei einer Dosis

von 200 mg Thalidomid/kg Körpergewicht eine 40% (ED₄₀) Reduktion der Gefäßpermeabilität der Tiere {25}. Eine Dosiserhöhung oder -eskalation führte nicht zu gesteigerten Effekten des Medikaments. Daher wurde auch in unserer Studie auf die Dosierung von 200 mg Thalidomid/kg Körpergewicht zurückgegriffen.

Betrachtet man die Bedeutung der Angiogeneese für die Anastomosenheilung in den ersten sieben Tagen, so erscheint es unerlässlich, vor der Anwendung antiangiogenetischer Substanzen in klinischen Versuchen die Effekte dieser Medikamente im Tierversuch zu überprüfen. Die Ergebnisse der Studie zeigen jedoch, daß auch unter intraperitonealer Thalidomidtherapie unmittelbar nach der Anlage einer Kolonanastomose die Sicherheit des Operationsergebnisses im Kaninchenmodell nicht beeinflußt wird. Bei der Anzahl der Gefäße zeigte sich zwar ein Unterschied zugunsten der Kontrollgruppe am dritten Tag, der jedoch am siebten Tag nicht mehr nachweisbar war. Dieser Unterschied resultierte nicht in einem niedrigeren Berstungsdruck am dritten postop. Tag in der Thalidomidgruppe. Am siebten postop. Tag war kein Unterschied bezüglich des Angiogenesekores oder des Berstungsdrucks festzustellen.

Der niedrigere Angiogenesekore am dritten Tag führte bei keinem Tier der Verumgruppe zu einer Anastomoseninsuffizienz. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß eine erhöhte Gefährdung der Anastomosenheilung durch die additive Gabe von Thalidomid intraperitoneal nicht hervorgerufen wird. Von Bedeutung ist desweiteren, daß bei 2 Tieren des dritten Tages und 4 Tieren des siebten Tages die Berstung unter der Testung anastomosenfern auftrat. Bei der statistischen Analyse ohne diese Tiere fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Berstungsdrucks zwischen den Gruppen. Die dargestellten Untersuchungsergebnisse stehen in

teilweise im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Untersucher. In einer Untersuchung an Ratten fanden Hendriks und Mitarbeiter eine signifikant schlechtere Anastomosenheilung nach intraperitonealer Gabe des Angiogeneseinhibitors Suramin {236}. Nach den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe konnte die intraperitoneale Gabe von Suramin nach der chirurgischen Therapie von kolorektalen Karzinomen nicht empfohlen werden. Die Auswirkung der intraperitonealen Applikation von Thalidomid unmittelbar nach der Anlage von gastrointestinalen Anastomosen ist bisher nicht untersucht worden. Die dargestellten Ergebnisse belegen, daß nach Anlage einer kolorektalen Anastomose die Morbidität und Mortalität im Tiermodell durch die Gabe von Thalidomid i.p. nicht erhöht werden. Das eröffnet theoretisch die Möglichkeit, dieses Medikament unmittelbar perioperativ zum Einsatz zu bringen. Darüberhinaus könnten die immunomodulatorischen Eigenschaften des Medikaments zu einer reduzierten inflammatorischen Reaktion führen. Ein Indiz dafür könnten die reduzierten Leukozytenzahlen in beiden Verumgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen am dritten und siebten Tag sein {14,20}. Patienten mit malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes könnten somit zu einem sehr frühen Zeitpunkt von einer antiangiogenetischen Therapie profitieren ohne die Gefahr einer erhöhten Morbidität oder Mortalität nach Anlage einer intestinalen Anastomose. Insbesondere Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen könnten nach chirurgischer Reduktion der Haupttumormasse von einer antiangiogenetischen Therapie der verbliebenen Mikro- oder Makrometastasen profitieren.

7. Gesamtdiskussion

Die chirurgische Resektion maligner Tumore stellt eine etablierte Therapie in der Behandlung gastrointestinaler Karzinome dar. Während bei niedrigen Tumorstadien (T_1 , T_2 , N_0) die Resektion der Karzinome zu befriedigenden Überlebensraten der Patienten führt, sind Karzinome ab einem Stadium T_3 , N_{1-3} mit einem hohen Rezidivrisiko vergesellschaftet. Die Rezidivprophylaxe bei diesen Patienten in höheren Tumorstadien besteht derzeit in der Gabe adjuvanter postoperativer Chemotherapeutika. Jedoch ist die Gabe von Chemotherapeutika zum Teil mit erheblichen, die Lebensqualität des Patienten einschränkenden Nebenwirkungen assoziiert. Desweiteren sprechen nicht alle Patienten auf die angewandten Therapeutika an. Obwohl die von KH Bauer (em. Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg, Begründer des Deutschen Krebsforschungszentrums) 1963 geprägte Aussage „Die Krebserkrankung ist primär immer eine lokalisierte Erkrankung, weshalb möglichst die radikale chirurgische Entfernung des Tumors anzustreben ist“ sich heutzutage als nicht zutreffend erwiesen hat, ist die chirurgische Therapie aus den Behandlungskonzepten solider Tumore nicht wegzudenken {177}.

Tumormetastasen und Lokalrezidive sind zum größten Teil für den Tod von Krebspatienten verantwortlich. Es ist jedoch häufig nicht möglich Mikrometastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und chirurgischen Primärbehandlung zu detektieren {166,167,168,169}. Klinische Studien zu Rezidiven bei unterschiedlichen Tumorentitäten konnten zeigen, daß klinisch nicht detektierbare Tumorzellen bei Patientinnen mit malignem Melanom sowie mit Brustkrebserkrankung nach initial erfolgreicher Therapie zunächst in eine Art Schlafzustand (engl. Dormancy)

übergangen, um dann nach einer undefinierten Zeitspanne in eine erneute schnelle Wachstumsphase einzutreten {170,171}. Deshalb bedeuten diese klinisch nicht erkennbaren Tumorzellen nach Monaten und Jahren eine potentielle Gefahr für den an Krebs erkrankten Patienten. Die Ursachen und Mechanismen auf zellulärer und biologischer Ebene, die für die Kontrolle der Tumorzellen während des Schlafzustandes verantwortlich sind werden intensiv erforscht, sind jedoch derzeit noch nicht vollständig geklärt. Es existieren unterschiedliche Hypothesen über die Ursachen des temporären Schlafzustands der Tumorzellen. Es könnte möglich sein, daß z. B. nach erfolgter Chemotherapie die Zellen eine längere Zeit aus noch ungeklärter Ursache in der G₀-Phase des Zellzyklus verharren, bevor sie nach ungeklärtem Stimulus erneut zu wachsen beginnen {172,173}. Andere Theorien besagen, daß die Kontrolle des Tumorwachstums über immunologische Prozesse oder hormonal gesteuert erfolgen könnte {174,175,176}. Ein genaues Verständnis der Regulationsvorgänge des Schlafzustandes der Tumorzellen könnte zusammen mit der Weiterentwicklung von Angiogenesehemmern zu besseren Einsatzmöglichkeiten dieser Medikamente führen.

Nach einer Vielzahl an Untersuchungen aus den letzten 10 Jahren kann als gesichert gelten, daß auch bei gastrointestinalen Karzinomen, die eine Domäne der primär chirurgischen Therapie darstellen, in einem hohen Prozentsatz zum Zeitpunkt der Operation zirkulierende Tumorzellen im Blut, Lymphknoten oder Knochenmark der Patienten nachgewiesen werden können {178,179,180,181,182,183,184,185,186,187, 188,189,190,191}. Tabelle 14). Die zirkulierenden Tumorzellen führen nicht

Tumor (Autor)	Marker	Technik	Gewebeart	Patientenanzahl	Detektion (%)	Prognose
Ösophagus ⁽¹⁷⁸⁾	BerEP4	ICC	Lymphknoten	68	62%	GÜ
Magen ⁽¹⁷⁹⁾	CK18	ICC	Knochenmark	97	35%	RFZ
Magen ⁽¹⁸⁰⁾	CK18	ICC	Knochenmark	180	53%	RFZ
Kolon ⁽¹⁸¹⁾	CK18	ICC	Knochenmark	88	32%	RFZ
Kolon ⁽¹⁸²⁾	CEA	RT-PCR	Lymphknoten	26	54%	GÜ
Kolon ⁽¹⁸³⁾	CK20	RT-PCR	Blut	65	65%	KA
Kolon ⁽¹⁸⁴⁾	CK20/CEA	RT-PCR	Lymphknoten	51	61%	KE
Kolon ⁽¹⁸⁵⁾	CK20/CEA	RT-PCR	Lymphknoten	13	100%	KA

Tabelle 14: Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark, Blut und Lymphknoten bei gastrointestinalen Karzinomen (GÜ= Gesamtüberlebenszeit vermindert, RFZ= rezidiv freie Zeit vermindert, K. A.= Keine Aussage in der Studie, K. E.= Kein Einfluß auf die Prognose).

zwangsläufig zu einem Rezidiv des Malignoms, denn eine Vielzahl dieser Zellen wird durch die körpereigene Immunabwehr erkannt und zerstört {192}. Entgehen solche Zellen jedoch dem Immunsystem, können sie den Ausgangspunkt für ein erneutes Tumorwachstum darstellen, und stellen somit eine große Herausforderung in der Gesamttherapie maligner Tumore dar. Das Ziel der Therapie maligner Tumore ist daher theoretisch die vollständige Eliminierung aller Tumorzellen des Patienten. Die Radikalität der chirurgischen Resektion ist von der Dissemination der Tumorzellen zum Zeitpunkt der Operation abhängig (Tabelle 15). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines soliden gastrointestinalen Karzinoms ist der Tumor meist technisch resektabel. Jedoch entwickelt ein hoher Prozentsatz zu einem späteren Zeitpunkt Metastasen, die wahrscheinlich in disseminierten Tumorzellen ihren Ursprung haben. Diese

Mikrometastasen sind mit den routinemäßig eingesetzten klinischen Stagingverfahren (Ultraschall, CT, MRT) häufig präoperativ nicht zu erfassen. Deshalb ist es derzeit gängige Praxis anhand der histopathologischen Untersuchung des Operationsresektates und des daraus resultierenden Tumorstadiums diejenigen Patienten zu identifizieren,

	Tumorzelldissemination	
Radikalität	Hämatogen/Peritoneal	Lymphogen
+	--	--
(+)	--	+
-	+	--
-	+	+

Tabelle 14: Radikalität der chirurgischen Therapie in Abhängigkeit der Tumorzelldissemination zum Zeitpunkt der Operation.

die von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren. Aus einer Vielzahl beschriebener prognostischer Parameter haben sich nur wenige, wie z.B. das TNM-Klassifikationssystem (UICC), in multivariaten Analysen als wirklich prognostisch relevant erwiesen {193,194}. Anzumerken bleibt zusätzlich, daß die TNM-Klassifikation ein „statistischer“ prognostischer Marker ist, der im Einzelfall bei der individuellen Konzeption einer Malignomtherapie kritisch betrachtet werden muß {194}.

Neben bereits vorhandenen Makrometastasen kann es auch könnte während der Operation zu einer Verschleppung von Tumorzellen kommen. In verschiedenen tierexperimentellen Studien wurde eine Tumorzellverschleppung während der

chirurgischen Manipulation an gastrointestinalen Karzinomen nachgewiesen {195,196,197}. Daher wurde durch Turnbull und andere Arbeitsgruppen die sogenannte „No-touch-isolation“ Operationstechnik bei kolorektalen Karzinomen gefordert {195,196,197}. Turnbull berichtete auch über eine verbesserte Prognose nach der Operation kolorektaler Karzinome in „No-touch-Technik“. Aufgrund widersprüchlicher Daten experimenteller und klinischer Studien der letzten Jahre ist diese Hypothese jedoch nicht generell akzeptiert {198,199}.

Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand erscheint es in ausgewählten Situationen sinnvoll, Patienten mit einer Karzinomerkrankung auch nach erfolgter R0-Resektion mit antiangiogenetischen Substanzen zu behandeln. Es ist derzeit nicht möglich, diejenigen Patienten sicher zu identifizieren, die von einer solchen Therapie profitieren würden. Eine Möglichkeit der Identifikation könnte die Bestimmung angiogenetischer Zytokine sein. In der dargestellten Studie zum kleinzelligen Bronchialkarzinom zeigten sich erhöhte prätherapeutische Serum-VEGF Konzentrationen, die besser mit dem Stadium der Erkrankung korrelierten, als etablierte prognostische Marker wie NSE, LDH oder Albumin. Ob dies jedoch bedeutet, daß Tumorpatienten mit einem erhöhten Serum-VEGF Spiegel gut auf eine antiangiogene Therapie ansprechen und dies zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führt ist derzeit nicht geklärt. Die klinische Prüfung von Angiogenesehemmern erfordert andere Kriterien als die Prüfung von Zytostatika. Da es sich bei diesen Substanzen nicht um zytotoxische Substanzen handelt, ist davon auszugehen, daß bei alleiniger Applikation nur selten eine Voll- oder Teilremission der Karzinomerkrankung zu erzielen ist. Erschwerend kommt hinzu, daß der Wirkungseintritt der Therapeutika eventuell erst nach Monaten eintritt. Daher scheint es notwendig, eine Kombination aus den etablierten Therapieformen der

chirurgischen Resektion und/oder Radio/Chemotherapie mit einer zusätzlichen antiangiogenetischen Therapie als neues Therapiekonzept zu entwickeln. Das Hauptziel einer antiangiogenetischen Therapie ist es, einen Progress einer Tumorerkrankung zu verhindern. Das Besondere an dieser Therapieform ist, daß bei einigen Substanzen die Zielzellen die Endothelzellen und nicht die Tumorzellen selbst sind. Andere Substanzen hemmen zusätzlich die Produktion angiogenetischer Zytokine aus Tumorzellen. Die normalen Endothelzellen sind genetisch stabil, so daß Resistenzmechanismen, wie sie bei der Applikation von Zytostatika auftreten, bisher nicht beschrieben wurden. Da Angiogenesehemmer dauerhaft verabreicht werden müssten, sollten sie eine gute Verträglichkeit aufweisen. Die Wirksamkeit der Angiogeneseinhibitoren kann nur in Phase-3-Untersuchungen, wie in der durch unsere Arbeitsgruppe erstmals bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom durchgeführten Untersuchung durch eine Verlängerung der Überlebenszeit bewiesen werden.

Prinzipiell ist die Anwendung von antiangiogenetischen Substanzen auch nach der Resektion gastrointestinaler Karzinome denkbar. Bei mehr als 45.000 Patienten wird jährlich in Deutschland ein kolorektales Karzinom diagnostiziert und etwa 30.000 Patienten versterben pro Jahr an den Folgen eines kolorektalen Karzinoms {200}. Damit ist das kolorektale Karzinom die häufigste maligne Erkrankung des Magen/Darm Trakts, und stellt die zweithäufigste Todesursache bösartiger Geschwülste in Deutschland dar {201}. Auch bei kurativ R-0 resezierten Patienten mit dieser Erkrankung besteht postoperativ bei 12-60% eine klinisch nicht detektierbare minimale residuale Tumorerkrankung {185-189;192,198,199}. Wie bereits oben diskutiert kommt es nicht bei allen nachgewiesenen Fällen von disseminierten Tumorzellen im peripheren

Blut oder dem Knochenmark zu einer Metastasen- oder Lokalrezidivbildung. Es ist derzeit nicht möglich, vor einer eventuellen antiangiogenetischen Therapie diejenigen Patienten zu identifizieren, bei denen eine solche Therapie auch wirklich notwendig und sinnvoll wäre. Die Suche nach Surrogatparametern zur Identifikation und Kontrolle von mit Antiangiogenesehemmern therapierten Patienten ist daher eine mindestens ebenso bedeutende wissenschaftliche Fragestellung wie die Suche nach einem geeigneten Wirkstoff selbst.

Anhand der dargestellten Tatsachen ist derzeit die intensive Evaluierung von neuen Therapiekonzepten mit einer Kombination aus chirurgischer, chemo- und strahlentherapeutischer und eventuell antiangiogenetischer Komponente bei der Behandlung von Karzinompatienten erforderlich. Viele Fragen zu der bestmöglichen Kombination dieser Therapieformen, sowie dem Zeitpunkt, der Intensität und Dauer der Therapie sind derzeit ungeklärt. Einerseits stehen Fragestellungen der Grundlagenforschung über die molekularbiologischen Pathomechanismen der Karzinomkrankung seit mehreren Jahrzehnten im Fokus der medizinischen Forschung. Andererseits scheint, basierend auf dem derzeitigen Erkenntnisstand, die Erforschung des klinischen Einsatzes von neuen Therapiekonzepten gerechtfertigt. Die Forschung sollte alle Aspekte der etablierten Therapieformen mit einschließen. Dies bedeutet auf das Gebiet der Angiogenese bezogen, daß der Einsatz von Angiogenesehemmern in Kombination mit etablierten chirurgischen Therapieformen überprüft werden muß. An erster Stelle steht hierbei die Frage, ob der Einsatz von Angiogenesehemmern bei chirurgisch sinnvoll resektablen Karzinomen medizinisch begründet werden kann. Dies scheint nach Lage der in dieser Arbeit zitierten Literatur aufgrund vieler experimenteller Studien, die einen hemmenden Effekt auf das

Wachstum von Karzinomzellen in-vitro und in-vivo belegen, der Fall zu sein. Danach sollte die Überprüfung der Therapie unter dem Aspekt des „nihil nocere“ Prinzips erfolgen. Denn die Voraussetzung für den Einsatz eines Angiogenehemmers ist, daß sich durch die modifizierte neue Therapieform keine negativen Folgen für den Patienten bezüglich Operationsmorbidity und Mortalität ergeben. In einem ersten Schritt sollte diese Fragestellung mit der dargelegten tierexperimentellen Studie zur Wirkung von intraperitoneal appliziertem Thalidomid auf die Heilung von Kolonanastomosen untersucht werden. Gleichzeitig ist bei begründeter Aussicht auf eine Verbesserung der Überlebenszeit der Einsatz von Angiogenehemmern bei Karzinomen mit besonders schlechter Prognose gerechtfertigt. Eine valide Aussage über die Effekte einer solchen Therapie kann nur im Rahmen prospektiv randomisierter Studien mit ausreichender Fallzahl getroffen werden. Anhand der dargelegten Ergebnisse konnte bezüglich der additiven Therapie von Thalidomid zusätzlich zu einer standardisierten Kombinationschemotherapie mit Adriamycin, Vincristin und Oncovin eine Verlängerung der Überlebenszeit unter Berücksichtigung der tumorbezogenen Mortalität belegt werden.

Der Wirkungsmechanismus von Thalidomid ist auch 48 Jahre nach der erstmaligen Synthese des Medikaments noch ungeklärt. Die Gründe für die Tatsache, daß dies trotz deutlich verfeinerter Untersuchungsmethoden und intensiver Bemühungen bis heute nicht gelungen ist, sind vielfältig:

1. Aus pharmakologischer Sicht erschwert die Razematisierung des Medikaments in Lösung in ein links und ein rechtsdrehendes Enantiomer die Untersuchung der Effekte von Thalidomid in-vivo enorm. Die weitere Metabolisierung nach der Hydrolyse in 12 verschiedene Spaltprodukte führt letztendlich zur Bildung von ca 100 Metaboliten. {202,203,204,205,206,207}.

2. Die Metabolisierung des Medikaments ist speziesspezifisch, so daß es nicht in jedem etablierten Tiermodell anwendbar ist {129}.
3. Aus der unterschiedlichen Konzentration angiogener Zytokine, die durch Tumore selber, aber auch durch Wirtszellen des Patienten produziert werden, kommt es zu einer differierenden Ansprechbarkeit auf Thalidomid in verschiedenen Experimenten.

Kotoh und Mitarbeiter fanden in einer tierexperimentellen Studie an Nacktmäusen, denen 2 verschiedene humane Ösophaguskarzinomzelllinien (ES 63 und ES 80) intraperitoneal appliziert wurden unterschiedliche Wirkungen von Thalidomid. Während bei der gleichen applizierten Thalidomidkonzentration (200 mg/kg KG/d) das Wachstum der ES63 - Zellen im Vergleich zu einer mit Placebo behandelten Kontrollgruppe signifikant geringer war, konnte bei der ES 80 Gruppe keine Reduktion des Tumorwachstums festgestellt werden {208}. Die Ursache dieser unterschiedlichen Wachstumshemmung lag nach Meinung der Autoren in der Tatsache begründet, daß die Zellen der ES63 Linie eine höhere Produktion an VEGF und bFGF aufwiesen (durch RT-PCR nachgewiesen). Zusätzlich könnte jedoch auch die körpereigene Produktion der Zytokine (Makrophagen, Thrombozyten) durch die unterschiedlichen Karzinome beeinflusst worden sein. Die Veränderung der VEGF Produktion durch Modulation der Thrombozyten- oder Makrophagenfunktion der Versuchstiere wurde in der zitierten Studie jedoch nicht untersucht. Es ist bei allen in dieser Monographie zitierten Untersuchungen unklar, ob Thalidomid bzw. ein wirksamer Metaboliten seine Wirkung durch Veränderung der Rezeptoren der Tumor- und/oder Endothelzellen oder durch Modulation der Zytokinexpression erzielt. Auch eine Addition beider Effekte wäre denkbar.

Es bleibt anzumerken, daß eine der augenfälligsten Missbildungen Neugeborener, deren Mütter während der Schwangerschaft Thalidomid eingenommen hatten, Hämangiome der Gesichtspartie (hauptsächlich Nasen Oberlippenregion) waren {209}. Diese Mißbildungen wurden retrospektiv von einigen Untersuchern als Anzeichen dafür gedeutet, daß Thalidomid hauptsächlich die Gefäßarchitektur und nicht die Endothelzellproliferation selbst beeinflussen könnte {210,211,212}.

Diese Vermutung steht allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen von Kaplan et al., Moreira et al sowie den eigenen in-vitro Proliferationsassays mit Kaninchenendothelzellen, deren Proliferation deutlich durch metabolisiertes Thalidomid gehemmt wurde.

4. Die Modulation der Integrinexpression auf Endothelzellen könnte eine weitere Ursache der gestörten Gefäßformierung unter Thalidomidtherapie darstellen.

Durch Untersuchungen von Kenyon et al. sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe um Neubert konnte eine Reduktion der Integrinexpression von avbeta3-Integrin auf Endothelzellen nach Inkubation mit Thalidomid nachweisen. Die verminderte Expression von avbeta-3 verhindert in einem hohen Grad die Fusion ausgewanderter Endothelzellen zu primitiven tubulären Strukturen aus denen letztendlich neue Gefäße entstehen. Es hat den Anschein, als ob dieser Vorgang die zur Gefäßneubildung notwendige Matrixinteraktion unterbricht, jedoch ist dieser Vorgang in seinen Einzelheiten noch nicht genau geklärt. Auch Friedländer konnte in einer tierexperimentellen Studie an Krallenaffen nachweisen, daß die verminderte Expression von avbeta-3 Integrinen eine Gefäßformierung

im Rahmen der Angiogeneese wirksam verhindert. Die α 3-Integrine sind auch in der Anastomosendurchbauung nach Darm Anastomosen von großer Bedeutung. Daher war es notwendig die Wirkung von Thalidomid auf die Heilung von Darm Anastomosen zu untersuchen, bevor an einen Einsatz in der Klinik gedacht werden kann. Mögliche Wirkungsweisen von Thalidomid sind in der Abbildung 27 (S115) zusammenfassend graphisch dargestellt. Auch die immunmodulatorischen Eigenschaften des Medikaments sind vielfältig. Die nachgewiesene Hemmung der TNF- α Produktion durch Thalidomid ist nicht mit einer Hemmung der IL-2 Produktion vergesellschaftet. Im Gegenteil scheint Thalidomid zu einer vermehrten Produktion von IL-2 zu führen und somit die anti-tumorspezifischen Eigenschaften dieses Zytokins zu fördern {222,223}. Berichte über die Wirkung von Thalidomid auf die Produktion von Interferon-Gamma sind uneinheitlich, jedoch überwiegen Ergebnisse, die eine stimulatorische Wirkung zeigen im Vergleich zu einer inhibitorischen Wirkung {217,221, 224,225}. Thalidomid inhibiert die Produktion von IL-6, IL-10 und IL-12 {217,224,225,226} und verstärkt die Produktion von IL-4 und IL-5 {224}. IL-6 ist ein potenter Wachstumsfaktor für maligne Plasmazellen und die Inhibition dieses Zytokins durch Thalidomid könnte teilweise zur Wirksamkeit des Medikaments bei Multiplem Myelom beitragen. Thalidomid inhibiert die Produktion von TNF- α durch Monozyten und T-Zellen {216,217,218,219,220,221}. Desweiteren unterstützt Thalidomid natürliche Killer (NK) Zellen in ihrer zytotoxischen Funktion und führt zu einer globalen Anhebung der Zahl der Lymphozyten (CD4+ und CD8+) {218,227}.

Zusätzlich zu den genannten Einflußfaktoren, die die Beurteilung des Wirkungsmechanismus von Thalidomid erschweren, sind zwei essentielle Fragen zum Verständnis des komplexen Prozeß der Tumorangiogeneese derzeit von enormer Bedeutung:

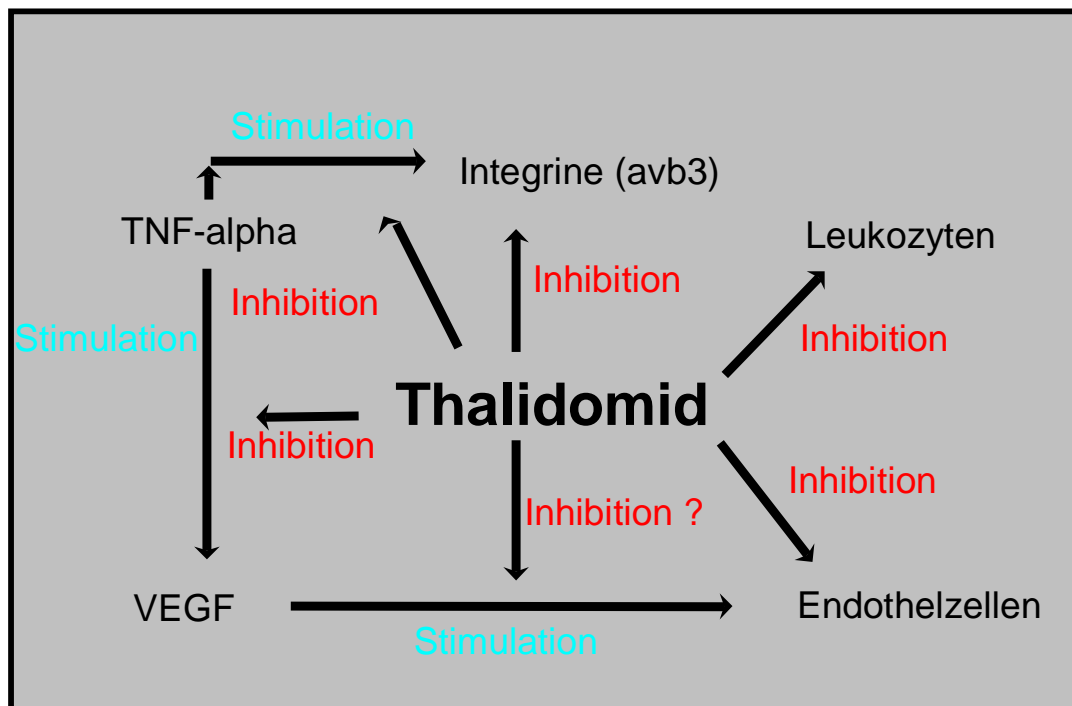


Abbildung 26: Graphische Darstellung möglicher Wirkungsmechanismen von Thalidomid während der Inhibition der Angiogenese..

1. Verläuft die Angiogenese während der Entwicklung eines Karzinoms in einem variablen Zeitraum über diverse nicht komplett nachvollziehbare Schritte und Vorstufen genetisch (?) determiniert, und ist damit unausweichlich mit der Karzinombildung verknüpft? Dies würde bedeuten, daß sobald Tumorzellen im Organismus entstanden sind, der Prozeß der Angiogenese ab einer Tumorgröße von wenigen Millimetern unausweichlich abläuft. Oder ist

2. in der Karzinogenese eine Beeinflussung des Gleichgewichts von angiogenen und antiangiogenen Faktoren durch die Tumorzellen in unterschiedlicher Weise (tumorspezifisch?) möglich und muß das Karzinom die Fähigkeiten zur Beeinflussung des Angiogenesesystems erst im Laufe der Karzinogenese „erwerben“? Vieles spricht für die zweite Hypothese, daß die Induktion der Tumorangiogenese eine

diskrete Komponente des tumorspezifischen Phänotyps ist, die während der Frühphase der Karzinogenese aktiviert wird. Folkman und Hanahan konnten am Beispiel transgener Mäuse verschiedene Stadien der Karzinogenese und damit der Tumorangiogenese ausführlich untersuchen {16}. Aus Ihren Studien läßt sich schließen, daß bereits in der Frühphase der Karzinomentwicklung das angiogene Gleichgewicht gestört und zugunsten der proangiogenetischen Faktoren verschoben wird. Auch in-vitro Untersuchungen an Endothelzellen deuten in diese Richtung der Angiogenesesteuerung. Gibt man zu kultivierten HUVEC Zellen angiogenetische Faktoren wie zB VEGF oder bFGF hinzu beginnen diese sich zu teilen. Diese Proliferation kann durch den endogenen Angiogenesehemmer Thrombospondin-1 (TSP-1) gehemmt werden. Die Proliferation kann jedoch durch weitere Gabe von VEGF oder bFGF wieder induziert werden {213,214}. Einen weiteren Beweis für die These, daß der Tumor selbst während der Karzinogenese angiogenetisch aktiv wird, lieferten Experimente von Dameron und Mitarbeitern, die Karzinomzellen mit funktionslosem Tumorsuppressorgen p53 mit diesem Gen transfizierten. Nach Transfektion wiesen die Zellen eine Hemmung der Angiogenese durch die zelleigene Thrombospondinproduktion auf, die sogar durch externe Hinzugabe von angiogenetischen Faktoren (bFGF) nicht zu übertreffen war. Die Tumorzellen wurden durch die eigene Produktion von Thrombospondin in die Apoptose überführt {215}.

Der exakte Mechanismus der Wachstumshemmung von Tumoren durch Thalidomid konnte bis heute nicht genau geklärt werden. Es scheint entweder eine singuläre Wirkung antiangiogener, immunomodulatorischer oder zytokinverändernder Eigenschaften des Medikaments oder eine Kombination dieser Wirkungen für die

tumorhemmenden Effekte verantwortlich zu sein.

Insgesamt läßt sich aus den dargestellten eigenen Ergebnissen und der Datenlage der Literatur zeigen, daß der Einsatz von Thalidomid in der Antiangiogenese möglich ist. Durch das National Institute of Cancer der FDA wurde die Angiogeneseforschung in der Krebsbekämpfung im Jahr 2001 offiziell zu einer der Hauptzielrichtungen der geförderten Forschung erhoben. Es scheint nicht mehr die Frage zu sein, ob Angiogenesehemmer in der Malignomtherapie eingesetzt werden sollten, sondern vielmehr bei welchen Indikationen, zu welchem Zeitpunkt, welche Substanz, über welchen Zeitraum und in welcher Dosierung die Medikamente gegeben werden sollten. Antworten auf diese Fragen werden in den nächsten Jahren den Einsatz von Thalidomid sowie anderen Angiogenesehemmern determinieren.

8. Zusammenfassung

Die Thesen dieser Monographie lauteten,

1. daß die additive Gabe des Angiogenehemmers Thalidomid zu einer Standardkombinationschemotherapie zu einer Verlängerung der Überlebenszeit bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom führt.
2. daß die Gabe von metabolisiertem Thalidomid in vitro zu einer Endothelzellproliferationshemmung von Kaninchenendothelzellen führt.
3. daß die Gabe von intraperitoneal appliziertem Thalidomid in vivo keinen negativen Einfluß auf die Heilung von Kolonanastomosen im Tiermodell hat.
4. daß ein hemmender Einfluß von Thalidomid auf die Ausbildung von intraabdominalen Adhäsionen nach Kolonanastomosen besteht.

In den dargelegten Untersuchungen konnte die erste These bestätigt werden. Die additive Gabe von Thalidomid führt zu einer Verlängerung der Überlebenszeit bei Patienten mit einem kleinzelligen Bronchialkarzinom. Erstmals konnte damit an einem homogenen Krankengut in einer prospektiv-randomisierten Doppelblind Untersuchung die Wirksamkeit des Angiogenehemmers Thalidomid beim kleinzelligen Bronchialkarzinom mit dem höchsten Studienevidenzgrad bewiesen werden. Dies stellt einen relevanten Fortschritt in der Therapie dieses Krankheitsbildes dar. Auch die zweite These konnte durch die vorgelegten Untersuchungsergebnisse bestätigt werden. Metabolisiertes Thalidomid inhibiert die Proliferation von Kaninchenendothelzellen in vitro und ist im Kaninchenmodell als Antiangiogenehemmer einsetzbar. Die dritte These konnte ebenfalls bestätigt werden. Der Berstungsdruck als Hauptzielkriterium der Anastomosenheilung im Kaninchenmodell wird durch die intraperitoneale Gabe des Angiogenehemmers

-hemmers Thalidomid nicht negativ beeinflusst. Diese Ergebnisse können sowohl die Grundlage für weitere Untersuchungen der Effekte von Thalidomid im Kaninchenmodell auf gastrointestinale Resektionen bilden, als auch den Einsatz dieses Antiangiogenesehemmers in der klinischen Situation vorbereiten. Die vierte These konnte bestätigt werden, da nach klinischem Scoring die Ausprägung von Adhäsionen in der Thalidomidgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer ausfiel

9. Schlußfolgerung

Durch in vitro und in vivo Versuche konnte bewiesen werden, daß die intraperitoneale Applikation des Angiogenehemmers Thalidomid nicht zu einer Gefährdung der Heilung von Kolonanastomosen führt. Diese Untersuchung könnte die Grundlage für einen Einsatz des Medikaments in der perioperativen Phase bei der chirurgischen Therapie von Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen darstellen. Darüberhinaus wurde eine Verminderung der Ausprägung von intraabdominalen Adhäsionen durch einen ungeklärten Mechanismus beobachtet. In einer prospektiv randomisierten Phase 3 Studie konnte eine Verlängerung der Überlebenszeit durch die additive Gabe von Thalidomid beim kleinzelligen Bronchialkarzinom nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studie könnten somit eine direkte Auswirkung auf die zukünftige Therapie bei Patienten mit dieser Erkrankung haben.

10. Ausblick

Nachdem durch die vorliegenden Untersuchungen bewiesen wurde, daß der additive Einsatz von Thalidomid zu einer Verlängerung der Überlebenszeit bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom führt, ist es möglich dieses Medikament in der Therapie dieser Tumorentität einzusetzen. Darüberhinaus scheint die intraperitoneale Gabe von Thalidomid im Kaninchenmodell keinen negativen Einfluß auf die Anastomosenheilung nach Kolonresektionen zu haben. Zusätzlich könnte die Applikation zu einer Reduktion der Adhäsionsbildungen postoperativ führen. Dies bedeutet, daß der Angiogenesehemmer Thalidomid zur unmittelbaren additiven Therapie nach kolorektalen Resektion im Rahmen von kontrollierten Studien auch beim Menschen mit einem vertretbaren Risiko untersucht werden könnte. Insbesondere bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium eines gastrointestinalen Karzinoms könnte im Rahmen kontrollierter Studien der Einsatz des Angiogenesehemmers im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzepts von Bedeutung sein. Die Rationale für einen sinnvollen Einsatz des Angiogenesehemmers ist nach Lage der Literatur und den eigenen Ergebnisse bei Tumorerkrankungen mit einer äußerst schlechten Prognose gerechtfertigt. Ein besonderes Augenmerk muß auf die strikte Einhaltung der kontrollierten Bedingungen der Untersuchungen des Medikaments gelegt werden, um folgenschwere Nebenwirkungen zu vermeiden. Dies darf jedoch nicht zu einer historisch begründeten Ablehnung des Medikaments führen. Gegenwärtig werden in den USA mehrere Studien zur additiven Wirksamkeit von Thalidomid in der Therapie des Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom durch das National Cancer Institut im Rahmen des sogenannten STEPS-Programm (**S**ystem for **T**halidomide **E**ducation and **P**rescribing **S**afety) durchgeführt. Die Studienergebnisse dieser Untersuchungen werden in den nächsten Jahren zeigen, ob Thalidomid eine sinnvolle Option in der Therapie des Nicht-

kleinzelligen Bronchialkarzinom darstellt. Wünschenswert sind ausserdem weitere Studien an Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom mit größeren Patientenzahlen, um die eigenen Ergebnisse verifizieren zu können.

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. med. JM Müller (Direktor der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Campus Mitte), der mich in den letzten Jahren kontinuierlich in meiner klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit unterstützt und geführt hat, und ohne dessen dauerhafte „Ermunterung“ diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Nicht minder dankbar bin ich Herrn PD Dr. med. W. Schwenk aus der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité, Campus Mitte, der immer ein Ansprechpartner und Ratgeber für alle Probleme bei der Planung und Gestaltung der durchgeführten Studien war, und dem ich auch bezüglich meiner klinischen Ausbildung in den vergangenen 5 Jahren viel verdanke.

Diese Arbeit wäre ohne die Initiative meines verehrten Freundes und Mentors Professor emeritus Alexander Doolas, MD, Head of the Department of General Surgery der Rush Presbyterian St Lukes University Chicago Illinois, USA niemals entstanden. Er vermittelte mir während meines Stipendiums in Chicago neben der Liebe zur Chirurgie auch die Möglichkeiten ersten wissenschaftlichen Arbeitens im Themengebiet der Angiogenese. Insbesondere bin ich meinem guten Freund und Kollegen Herrn Dr. med. Christian Pollmann zu Dank verpflichtet mit dem sämtliche wissenschaftliche Arbeiten entstanden, der in vielen nächtlichen fruchtbaren Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beitrug, und ohne dessen Mitarbeit diese Monographie nicht hätte entstehen können. Danken möchte ich auch Herrn Dr. med. Kai Zwingenberger (Grünenthal AG, Aachen), der sowohl finanziell als auch in wissenschaftlichen Fragen stets hilfsbereit und zugewandt war. Einen ausserordentlich bedeutenden Beitrag hat meine Frau Tine Mall zu dieser Arbeit geleistet, indem Sie klaglos meine vielen in der Klinik verbrachten

Stunden ertragen hat, die zur der Erstellung der Monographie notwendig waren, und die mich immer vorbehaltlos unterstützt hat. Zuletzt möchte ich meinen Eltern Rita und Dr. med. Werner Mall dafür danken, daß Sie mir mein Medizinstudium und meine Ausbildung zum Chirurgen ermöglicht haben, und mir im Laufe meines bisherigen Lebens jede erdenkliche Unterstützung zu Teil haben werden lassen. Sie können selbst am Besten ermessen, welchen Wert Ihre Hilfe zum Gelingen dieser Arbeit hatte.

Literaturverzeichnis

- 1 Gimbrone MAJ, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J (1972). Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med.*163,261-276.
- 2 Folkman J, Shing Y (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem.*267:10931-10934.
- 3 Brem S, Brem H, Folkman J, Finkelstein D, Patz A (1976) Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Res.*36:2807-2812.
- 4 Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J (1995) Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med.*1:149-15.
- 5 Ferrara N. Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells (1989). *Biochem Biophys Res Commun.*161:831-8.
- 6 Leung DW. Cachianes G. Kuang WJ. Goeddel DV. Ferrara N (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted mitogen. *Science.* 246:1306-9.
- 7 Keck PJ. Hauser SD. Krivi G. Sanzo K. Warren T. Feder J. Connolly DT (1989).
- 8 Christofori G (1996). The role of fibroblast growth factor in tumor progression and angiogenesis. In *Tumor angiogenesis*. R. Bicknell, CE Lewis and N Ferrara, eds (Oxford Press).
- 9 Folkman J, Shing Y (1992). Angiogenesis. *J Biol Chem.*267:10931-10934.
- 10 Friesel RE, Maciag T (1995). Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal. *FASEB J*;9: 919-925.
- 11 Risau W, Flamme I (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.*11:73-91.
- 12 Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Peruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*;219:983-985.
- 13 Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U (1996). Vascular Endothelial Growth Factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;93:2476-2581.
- 14 Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Abraham H, Wood WJ (1996). Vascular Endothelial Growth Factor- related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt-4. *Proc Natl Acad Sci USA*;93:1988-1992.

- 15 Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ (1995). Expression of vascular permeability factor (Vascular Endothelial Growth Factor) and its receptors in human breast cancer. *Hum Pathol*;26:86-91.
- 16 Hanahan D, Folkman J (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*;86:353-364.
- 17 Weidner N. Semple JP. Welch WR. Folkman J (1991). Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 324:1-8.
- 18 Saclarides TJ. Speziale NJ. Drab E. Szeluga DJ. Rubin DB (1994). Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 37: 921-926.
- 19 Machianini P. Fontanini G. Hardin JM. Squartini F. Angeletti FA (1992). Relation of neovascularization to metastasis of non-small cell lung cancer. *Lancet*. 340: 45-46.
- 20 Li VW. Folkert RD. Watanabe H. Yu C. Rupnik M. Barnes P. Scott RM. Black PM. Sallan SE, Folkman J (1994). Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumors. *Lancet*. 334: 82-86.
- 21 Weidner N. Carroll PR. Flax J. Blumenfeld W. and Folkman J (1993). Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*. 143:401-409.
- 22 Millikan KW, Mall JW, Myers J, Hollinger EF, Doolas A, Saclarides TJ (2000). Do Angiogenesis and Growth Factor Expression predict Prognosis of Esophageal Cancer?“. *Am Surg*. 66(4):401-405; discussion 405-6.
- 23 Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck NP (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*;265:1582-1584.
- 24 Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA*;87:6624-6628.
- 25 Metchnikoff E.. “Über die Immunität” . In C.R. 13^{ème} Congrès Internationale de Medicine, 1900 Paris, Section bacteriologie et parasitologie:11-27.
- 26 Engermann RL, Pfaffenbach D, Davis MD (1967). Cell turnover of capillaries. *Lab Invest*, 17:738-743.
- 27 Hobson B Denekamp J (1984). Endothelial proliferation in tumors and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer*;49:405-413.

- 28 Barinaga M (1997). From bench top to bedside. *Science*. Nov 7;278(5340):1036-9.
- 29 Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, et al (1999). Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*;93:3064-3073.
- 30 Ma J, Pulfer S, Li S, Chu J, Reed K, Gallo JM (2001). Pharmacodynamic-mediated reduction of temozolomide tumor concentrations by the angiogenesisinhibitor TNP-470. *Cancer Res*. Jul 15;61(14):5491-8.
- 31 Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1999;341(21):1565-1571.
- 32 O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, et al. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. *Cell*; 79:315-328.
- 33 De Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP (2001). Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in breast cancer: relation to apoptotic rate. *Breast Cancer Res Treat*. Apr;66(3):201-8.
- 34 Neal DE, Marsh C, Bennett MK, Abel PD, et al (1985). Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: Comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet*; 1:366-36.
- 35 Mendel DB, Laird AD, Smolich BD, Blake RA, et al (2000). Development of SU5416, a selective small molecule inhibitor of VEGF receptor tyrosine kinase activity, as an anti-angiogenesis agent. *Anticancer Drug Des*.Feb;15(1):29-41. Review.
- 36 Xu X, Shen J, Mall JW, Myers JA, et al (1999). In vitro and in vivo antitumor activity of a novel immunomodulatory drug, leflunomide: Mechanisms of action. *Biochem Pharmacol*; 58,9:1405-1413.
- 37 Xu X, Williams JW, Bremer EG, Finnegan A, Chong AS F (1995). Inhibition of protein tyrosine kinase phosphorylation in T cells by a novel immunosuppressive agent, leflunomide. *J Biol Chem*;270:12398-12403.
- 38 Shawver LK, Schwartz DP, Mann E, Chen H, et al (1997). Inhibition of plateled derived growth factor mediated signal transduction and tumor growth by N-[4-(trifluormethyl)-phenyl]5-methylisoxazole-4-carboxamide. *Clin Cancer Res*; 3:1167-1177.

- 39 Mall JW, Myers JA, Xiulong Xu, Saclarides TJ, AW Philipp, Pollmann C (2002). Leflunomid reduziert den Angiogenesescore und das Tumorwachstum subkutan implantierter Kolonkarzinomzellen im Mausmodell. *Chirurg*; 73:716-720..
- 40 Vlassenko AG, Thiessen B, Beattie BJ, Malkin MG, Blasberg RG (2000). Evaluation of early response to SU101 target-based therapy in patients with recurrent supratentorial malignant gliomas using FDG PET and Gd-DTPA MRI. *J Neurooncol*;46(3):249-59.
- 41 Zwingenberger K, Wnendt S (1996). Immunomodulation by Thalidomide: Systematic Review of the Literature and of unpublished observations. *J Inflamm*, 46:177-211.
- 42 Ericsson T, Björkman S, Roth B, Fyge A, Höglund P (1995). Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality*, 7:44-52.
- 43 Koransky W, Ullberg S (1964). Autoradiographic investigations of c-labelled thalidomide and glutethimide in pregnant mice. *Proc Soc Exp Biol Med*, 116: 512-516.
- 44 Wiedemann HR (1961). Hinweis auf eine derzeitige Häufung hypo- und aplastischer Fehlbildung der Gliedmassen. *Med Welt*, 37:1863.
- 45 Mc Bride WG (1961). Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*, (16.12.):1358.
- 46 Mellin G, Katzenstein M (1962). The saga of thalidomide (concluded). *NEJM*;267:1238-1244.
- 47 Neubert R, Neubert D (1996). Peculiarities and possible mode of action of thalidomide. In: Kavlock RJ, Daston GP, eds. *Drug Toxicity in Embryonic development (Handbook of Experimental Pharmacology)* Vol.124/II. Berlin: Springer Verlag,:41-119.
- 48 Calabrese L, Fleischer AB (2000). Thalidomide: Current and potential applications. *Am J Med*;108:487-495.
- 49 Ochnisky S, Verroust J, Bastuji-Garin S, et al.(1994). Thalidomide neuropathy incidence and clinico-electrophysiological findings in 42 Patients. *Arch Dermatol*,130(1):66-9.
- 50 Thalidomide (Package Insert). Warren, NJ; Celgene Corporation., 1998. 49.
- 51 Stephens TD, Bunde CJW, Fillmore BJ (2000) Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. *Biochem Pharm* 12: 1489-1499.
- 52 Paulitschke M, Mall JW, Büttemeyer R et al.(2002). Vascular PTFE grafts endothelialised under defined flow: from in-vitro data to clinical use. *Int J Art Org*; 25:632-634.
- 53 Moreira AL, Sampaio EP, Zmudzinas A et al.(1993) Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med*;177:1675-80.

- 54 Rowland TL, Mc Hugh SM, Deighton J, et al. (1998) Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacol*; 40:11-20.
- 55 Tavares JL, Wangoo A, Dilworth P, et al. (1997). Thalidomide reduces tumour necrosis factor alpha production by human alveolar macrophages. *Respir Med*;91(1):31-9.
- 56 Moreira AL, Tsenova-Berkova L, Wang J et al. (1997)Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tubercle Lung Dis*; 78:47-55.
- 57 Kaplan G, Moreira AL, (1993).Cytokine regulation of disease progression in leprosy and tuberculosis. *Immunobiology*;191(4-5):564-8.
- 58 Faure M, Thivolet J, Gaucherand M (1980). Inhibition of PMN leucocytes chemotaxis by thalidomide. *Arch Dermatol Res*;269:275-280.
- 59 Geitz H, Handt S, Zwingenberger K (1996). Thalidomide selectively modulates the density of cell surface molecules involved in the adhesion cascade. *Immunopharmacology*;131:213-221.
- 60 Barnhill RL, Doll NJ, Millikan LE, et al (1984). Studies on the anti-inflammatory properties of thalidomide: effects on polymorphonuclear monocytes and lymphocytes. *J Am Acad Dermatol*;11:814-819.
- 61 Mc Hugh SM, Rifkin IR, Deighton J, Wilson AB, Lachmann PJ, Ewan PW, Lockwood CM (1995). The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin Exp Immunol*, 99:160-167.
- 62 Moller DR, Wysocka M, Greenlee BM et al (1997) Inhibition of IL-12 production by thalidomide. *J Immunol*;159:5157-5161.
- 63 Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G (1991). Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med*, 173:699-703.
- 64 Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, et al (1993). Thalidomide exerts its inhibitor action on tumour necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation.*J Exp Med*;177(6):699-703.
- 65 Klausner JD, Freedman VH, Kaplan G (1996). Thalidomide as an anti- TNF- α -inhibitor: implications for clinical use. *Clin Immunol Immunopathol*;81:219-223.

- 66 Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, et al (1992). Prolonged treatment with recombinant interferon γ induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients J Exp Med;175:1729-1737:
- 67 Sarno EN, Grau GE, Vieira LMN, Nery JA (1991). Serum levels of TNF- α and interleukin-1 β during leprosy reactional states. Clin Exp Immunol;84:103-108.
- 68 Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A et al (1993). The influence of thalidomide on clinical and immunological manifestations of erythema nodosum leprosum. J Infect Dis;168:408-414.
- 69 Jacobson JM, Greenspan JS, Spritzler J et al (1997). Thalidomide for the treatment of aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. NEJM;336:1487-1493.
- 70 Wolkenstein P, Latarjet J, Roujeau JC (1998). Randomised comparison of thalidomide versus placebo in toxic epidermal necrolysis. Lancet;352:1586-1589.
- 71 Strieter RM, Kunkel SJ, Bone RC (1993) Role of tumor necrosis factor – alpha in disease states and inflammation. Crit Care Med;21:447-463.
- 72 Davidsen SK, Summers JB (1995). Inhibitors of TNF- α synthesis. Exp Opin Ther Patents;5:1087-1100.
- 73 Dixon SC, Kruger EA, Bauer KS, Figg WD (1999). Thalidomide up-regulates prostate-specific antigen secretion from LNCaP cells. Cancer Chemother Pharmacol; 43 (Suppl):78-84.
- 74 Nguyen M, Tran C, Barsky S, et al. (1997) Thalidomide and chemotherapy combination: preliminary results of preclinical and clinical studies. Int J Oncol.;10:965-969.
- 75 Wnendt S, Finkam M, Winter W, Raabe G, Ossig J, Zwingenberger K (1996). Enantioselective inhibition of TNF-alpha release by thalidomide and thalidomide analogues. Chirality;8(5):390-6.
- 76 Neubert R, (1996). Thalidomide. In Spencer PS, Schaumburg HS (eds): „Experimental and clinical Neurotoxicology „2nd ed. Oxford University Press.
- 77 Gardner-Medwin JM (1996). Thalidomide in autoimmune conditions. Exp Opin Invest Drugs, 5:829-841.
- 78 Swartz GM, Fogler WF, Shah JH, Papathanassiou A, Madsen JW, Green SJ (1998). Partially reduced analog of thalidomide inhibits experimental metastases in a murine B16-BL6 melanoma model. Proc Am Assoc Cancer Res, 39:46.

- 79 Nguyen M, Tran C, Barsky S, Sun JR, Mc Bride W, Pegram M, Pietras R, Love S, Glaspy J (1997). Thalidomide and chemotherapy combination: Preliminary results of preclinical and clinical studies. *Int J Oncol*, 10(5): 965-969.
- 80 Gutman M, Szold A, Ravid A, Lazauskas T, Merimsky O, Klausner JM (1996). Failure of thalidomide to inhibit tumor growth and angiogenesis in vivo. *Anticancer Res*; 16(6B): 3673-3677.
- 81 Kotoh T, Dhar KD, Masunaga R et al. (1999). Antiangiogenic therapy of human esophageal cancers with thalidomide in nude mice. *Surgery*;125:536-44.
- 82 Minchington AI, Fryer KH, Wendt KR, et al. (1996). The effect of thalidomide on experimental tumors and metastases. *Anti-Cancer Drugs*;7:339-343.
- 83 Verheul HM, Panigraphy D, Yuan J, D'Amato RJ. (1999)Combination therapy with thalidomide and sulindac inhibits tumor growth in rabbits. *Br J Cancer*;79:114-118.
- 84 Singhal S, Mehta J, Eddlemon P, et al. (1998). Marked Anti-tumor-effect from anti-angiogenesis therapy with Thalidomide in high risk refractory multiple myeloma. *Blood* 92, 10 Suppl. 318a.
- 85 Barlogie B, Desikan R, Munshi N, Singhal S, et al. (1998). Single course D.T. PACE Anti-Angiochemotherapy effects CR in plasma cell leucemia and fulminant multiple myeloma. *Blood* 92, Suppl. 1:273b.
- 86 Politi P, Reboredo G, Losso M, Vujacich G, et al. (1998). Phase I trial of thalidomide in AIDS-related Kaposi Sarcoma. *ASCO* 17:41a.
- 87 Bower M, Howard M, Gracie F, Phillips R, Fife K (1997). A phase II study of thalidomide for Kaposi's sarcoma: Activity and correlation with KSHV DNA load. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 14(4):28-30.
- 88 Fine HA, Loeffler JS, Kyritsis A, Wen P, et al. (1997). A phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high grade gliomas. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology* 16: A1372.
- 89 Zeldis JB, Williams BA, Thomas SD, Elsayed ME (1999). S.T.E.P.S.: a comprehensive program for controlling and monitoring access to thalidomide. *Clin Ther*;21:319-330.
- 90 Salven P, Ruotsalainen T, Mattson K, Joensuu H (1998). High pre-treatment serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*; 17 ; 79(2):144-146.

- 91 Takigawa N, Segawa Y, Fujimoto N, Hotta K, Eguchi K. (1998). Elevated vascular endothelial growth factor levels in sera of patients with lung cancer. *Anticancer Res*;18(2B):1251-4.
- 92 Matsuyama W, Hashiguchi T, Mizoguchi A, et al. (2000). Serum levels of Vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer. *Chest*;118 (4):948-51.
- 93 German Cancer Society: Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien, 2000; B15: 218-234.
- 94 Manegold C, Bülzebruck H, Drings P, Vogt-Moykopf I (1989). Prognostische Faktoren beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. *Onkologie* 12:240-245.
- 95 Schalhorn A. in Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge bei Tumoren der Lunge und des Mediastinums. 3. Auflage.1995. Schriftenreihe des Tumorzentrum München.
- 96 Livingston RB (1980). Small cell carcinoma of the lung. *Blood* 56:575-584.
- 97 Livingston RB (1988). Treatment of the advanced non-small-cell-carcinoma of the lung: The Southwest oncology Group experience. *Sem Onco*15, Suppl; 7:37-41.
- 98 Seeber S, Niederle N (1983). Chemotherapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. In Hellriegel KP, Sack H (Hrsg): *Bronchialkarzinom, Mammakarzinom*, pp 11-18. Springer ,Heidelberg New York.
- 99 Kelly K (2000). New chemotherapeutic agents for small cell lung cancer. *Chest*;117(Suppl.4):156S-162S.
- 100 Roth BJ, Johnson DH, Einhorn LH, et al. (1992). Randomized study of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristin versus cisplatin etoposide versus alternation of these regimens in small cell lung cancer: a phase III trial of the Southeastern cancer study group. *J Clin Oncol*;10:282-291.
- 101 Watine J (1999). Laboratory variables as additional staging parameters in patients with small cell lung carcinom. A systematic Review. *Clin. Chem. Lab. Med.*;37(10):931-938.
- 102 Keller T, Bitterlich N, Hilfenhaus S, Bigl H, Loser T, Leonhardt P (1998). Tumour markers in the diagnosis of bronchial carcinoma: new options using fuzzy logic-based tumour marker profiles. *J. Cancer Res. Clin Oncol*;124(10):565-574.
- 103 Beinert T, Binder D, Oehm C et al. (2000). Further evidence for oxidant-induced vascular endothelial growth factor up-regulation in the bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients undergoing radio-chemotherapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*Jun;126(6):352-356.
- 104 De Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P. Expression of growth factors, growth factor inhibitors and their receptors in invasive breast cancer. *J. Pathol.* 1998; 184(1):53-7.

- 105 Brown LF, Berse B, Jackman RW (1995). Expression of vascular permeability factor (Vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Human Pathol.*;26:86-91.
- 106 Nielsen HJ, Werther K, Mynster T, Svendsen MN, Rosendahl S et al.. Bacteria-induced release of white cell- and platelet-derived-vascular endothelial growth factor in vitro. *Vox Sang*,2001;80(3):170-8.
- 107 Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE et al.. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br. J. Cancer*, 1998;78:956-964.
- 108 Möhle R, Green D, Moore MAS, Machman RL et al.. Constitutive production and thrombin-release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94:663-668.
- 109 Wolf M. Havemann K. (1995): Kleinzelliges Bronchialkarzinom. In: Seeber S. Schütte J. (Hrsg) *Therapiekonzepte Onkologie*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio. S. 421-427.
- 110 Thiele K.-P. (1997). Prognostische Faktoren und Therapiestrategien beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. In: *Klinische Onkologie '97. Praxis*. Verlag Hans Huber Bern.S.154a-h.
- 111 Jett JR, Everson L, Thernau TM, et al. (1990). Treatment of limited stage small-cell lung cancer with Cyclophosphamide, Doxorubicin and Vincristine with or without Etoposide: A randomised trial of the North Central Cancer Treatment Group. *J Clin Oncol*. 8:33-38.
- 112 Mc Cracken JD, Janaki LM, Crowley JJ et al (1990). Concurrent Chemotherapy/Radiochemotherapy for limited small-cell disease Carcinoma: A Southwest Oncology Group Study. *J of Clin Oncol*. 8:892-898.
- 113 Spiegelmann D, Maurer H, Ware JH, Perry MC, Chaniian AP, Comis R, Waton W, Zimmer B, Green M (1989). Prognostic factors in small cell lung cancer of the lung: an analysis of 1521 patients. *J Clin Oncol*. 7:344-354.
- 114 Wolf M. Havemann K. Holle R. et al (1987). Cisplatin-Etoposide versus Ifosfamide-Etoposide combination chemotherapy in small cell lung cancer: A Multicenter German Randomized Trial. *J Clin Oncol* 5:1880-1889.
- 115 Manegold C, Bülzebruck H, Drings P, Vogt-Moykopf I (1989). Prognostische Faktoren beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. *Onkologie* 12:240-245.

- 116 Schalhorn A. in Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge bei Tumoren der Lunge und des Mediastinums. 3. Auflage.1995. Schriftenreihe des Tumorzentrum München.
- 117 Livingston RB (1980). Small cell carcinoma of the lung. *Blood* 56:575-584.
- 118 Livingston RB (1988). Treatment of the advanced non-small-cell-carcinoma of the lung: The Southwest oncology Group experience. *Semin Oncol*15, Suppl; 7:37-41.
- 119 Seeber S, Niederle N (1983). Chemotherapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. In Hellriegel KP, Sack H (Hrsg): Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, pp 11-18. Springer ,Heidelberg New York.
- 120 Lassen U, Osterlind K, Hansen M, Dombernowsky P, Bergman B, Hansen HH. Long-term survival in small-cell lung cancer: Posttreatment characteristics in patients surviving 5 to 18+ years – an analysis of 1714 consecutive patients. *J Clin Oncol* 1995;13:1215-1220.
- 121 Jensen PB, Sehested M, Langer SW, Hansen HH. Twenty-five years of chemotherapy in small cell lung cancer sends us back to the laboratory. *Cancer Treat Rev* 1999;25:377-386.
- 122 Postmus PE, Schramel FM, Smit EF. Evaluation of new drugs in small cell lung cancer: the activity of gemcitabine. *Semin Oncol* 1998;25:79-82.
- 123 Osterlind K: Chemotherapy in small cell lung cancer. *Lung Cancer; European Respiratory Monograph* 2001;Vol. 6:234-258.
- 124 Ericsson T, Björkman S, Roth B, Fyge A, Höglund P (1995). Stereospecific determination, chiral inversion in vitro and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality*, 7:44- 52.
- 125 Galligioni E, Ferro A (2001). Angiogenesis and antiangiogenic agents in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*;34:3-7.
- 126 Wong MP, Chan SY, Fu KH et al (2000). The angiopoietins tie2 and vascular endothelial growth factor are differentially expressed in the transformation of normal lungs to non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer*;29:11-22.
- 127 Yamashita J, Ogawa M, Abe M, Nishida M (1999). Platelet derived growth factor/ thymidine phosphorylase concentrations differ in small cell and non-small cell lung cancer. *Chest*;116 (1):206-211.
- 128 Vesela D, Jelinek R (1994). Embryotoxicity in chick embryo of thalidomide hydrolysis products following metabolic activation by rat liver homogenate. *Funct Dev Morphol*; 4:313-316.
- 129 Bauer KS, Dixon SC, Figg WD (1998). Inhibition of angiogenesis by thalidomide requires

- metabolic activation, which is species –dependent.
- 130 D’Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci*; 91:4082-4085.
- 131 Stephens TD, Fillmore BJ (2000). Hypothesis: Thalidomide embryopathy – Proposed mechanism of action. *Teratology*; 61:189-195.
- 132 Moreira AL, Friedlander DR, Shif B, Kaplan G, Zagzag D (1999). Thalidomide and a thalidomide analogue inhibit endothelial cell proliferation. *J Neurooncol*; 43:109-114.
- 133 Miller JM, Ginsberg M, McElfatick GC, Shonberg IL (1960). The anti-inflammatory effect and the analgetic property of thalidomide-268. *Antibiot Med Clin Ther.* 7:743-746.
- 134 Nogueira AC, Gräfe M, Neubert R (1995). Effect of thalidomide and some derivates on the adhesion of lymphocytes to endothelial cells. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 351 (Suppl):R130.
- 135 Stephens TD, Bunde CJW, Fillmore BJ (2000). Mechanism of action in thalidomide teratogenesis. *Biochem Pharm*,59;12:1489-1499.
- 136 Parman T, Wiley MJ, Wells PG (1999). Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med*,5:582-585.
- 137 Koch H (1981). Die Arenoxid-Hypothese der Thalidomid-Wirkung. Überlegungen zum molekularen Wirkungsmechanismus des klassischen Teratogens. *Sci Pharm* 49:67-99.
- 138 Langer S (1978). Colon-Nahttechnik: einreihige Naht. *Langenbeck´s Arch Chir*;347:601-604.
- 139 Jacobs G, Ulrich B (1981). Klammernahtgeräte an Magen und Dünndarm. *Langenbeck´s Arch Chir*;355:465-469.
- 140 Ellison GW (1989). Wound healing in the gastrointestinal tract. *Semin Vet Med Surg*;4:287-293.
- 141 Halsted WS (1887). Circular suture of the intestine – an experimental study. *Am J Med Sci*;94:436-461.
- 142 Junginger Th, Pichlmayr H. Nahtmaterialien und Nahttechniken in der Kolonchirurgie. In: Thiede A, Hamelmann H (Hrsg.) *Moderne Nahtmaterialien und Nahttechniken in der Chirurgie*. Berlin Heidelberg New York 1982:288-295.
- 143 Brasken P, Lehto M, Renvall S (1990). Fibronectin, Laminin and collagen types I, III, IV and V in the healing rat colon anastomosis. *Ann Chir Gynecol*; 79:65-71.

- 144 Grinnel F, Billingham R, Burgess L (1981). Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *J Invest Dermatol*;76:181-189.
- 145 Lehto M, Duance VC, Restall D (1985). Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. *J Bone Joint Surg (Brit)*;67:820-828.
- 146 Leder LD. Wundheilung und Fremdkörperreaktion. In Thiede A, Hamelmann H (Hrsg.) *Moderne Nahtmaterialien und Nahttechniken in der Chirurgie*. Berlin Heidelberg New York 1982:226-228.
- 147 Kerscher P, Wunsch HP, Lehmann L, Eich J. Ist die alleinige Naht der Submukosa eine Alternative zu den bisherigen Nahttechniken ? In Thiede A, Hamelmann H (Hrsg.) *Moderne Nahtmaterialien und Nahttechniken in der Chirurgie*. Berlin Heidelberg New York 1982:135-144.
- 148 Epstein EH, Munderloh NH (1975). Isolation and characterization of CNBr peptides of human [1(III)] 3 collagen and tissue distribution of [1(I)] 2 and [1(III)] 3 collagens. *J Biol Chem*;25:9304-9312.
- 149 Spjut HJ (1974). Microangiographic study of gastrointestinal lesions. *Am J Roentgenol*;92:1173-1187.
- 150 Abramovitz HB, Mc Alister WH (1969). A comparative study of small-bowel anastomoses by angiography and microangiography. *Surgery*;66:564-569.
- 151 Stelzner F (1982). Vorbeugung der intraperitonealen Nahtinsuffizienz (Dünn- und Dickdarm). *Langenbeck's Arch Chir*;358:259-263.
- 152 Martens MFWC, Hendriks T (1991). Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. *Gut*;32:1482-1487.
- 153 Wise L, Mc Alister W, Stein T, Schuck P (1975). Studies on the healing of anastomoses of small and large bowel. *Surg Gynecol Obstet*;141:190-194.
- 154 Nahai F, Lamb JM, Havican RG, Stone HH (1977). Factors involved in disruption of intestinal anastomoses. *Am Surg*;43:45-51.
- 155 Martens MFWC, Hendriks T (1989). Collagen synthesis in explants from rat intestine. *Biochem Biophys Acta*;993:252-258.
- 156 Pessa ME, Bland KI, Copeland III EM (1987). Growth factors and determinants of wound repair. *J Surg Res*;42:207-217.

- 157 Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF (1986). The biology of platelet derived growth factor. *Cell*;46:155-169.
- 158 Barbul A, Caldwell M, Hunt TK (Eds). Growth factors and other aspects of wound healing: Biological and clinical implications. *Progr in Clin and Biol Research*, Vol 266, Alan Liss. New York 1988.
- 159 Brasken P, Renvall S, Sandberg M (1991). Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in healing colonic anastomoses in rats. *Eur J Surg*;157:607-611.
- 160 Kingsnorth AN, Vowles R, Nash JRG (1990). Epidermal growth factor increases tensile strength in intestinal wounds in pigs. *Brit J Surg*;77:409-412.
- 161 Mateo RB, Reichner JS, Albina JE (1995). IL-6 activity in wounds. *Am J Physiol*; 35:R1840-1844.
- 162 Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z (1988). Wound macrophages express TGF- β and other growth factors in vivo. Analysis by m-RNA phenotyping. *Science*;241:708-712.
- 163 Brasken P (1991). Healing of experimental colonic anastomosis. *Eur J Surg*;157 (Suppl 566):1-51.
- 164 Jensen JA, Hunt TK, Scheuenstuhl H, Banda MJ (1986). Effect of lactate, pyruvate and pH on secretion of angiogenic and mitogenic factors by macrophages. *Lab Invest*;54:574-578.
- 165 Polverini PJ, Cotran RS, Gimbrone jr MA, Unanue ER (1977). Activated
- 166 Weinstat-Saslow D, Steeg PS (1994). Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: Basic and applied advances. *FASEB*; 8:401-407.
- 167 Fidler IJ (1991). Cancer metastasis. *Br Med Bull*; 47:157-177.
- 168 Fidler IJ, Ellis LM (1994). The implication of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*; 79:185-188.
- 169 De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (1993). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*.134-149 (Lipincott, Philadelphia)
- 170 Crowley NJ, Seigler HF (1992). Relationship between disease-free-interval and survival in patients with recurrent melanoma. *Arch Surg*;127:1303-1308.
- 171 Demichelli R et al. (1994). Local recurrences following mastectomy: Support for the concept of tumor dormancy. *J Natn Cancer Inst*;86:45-48.
- 172 Meltzer A (1990). Dormancy and breast cancer. *J Surg Oncol*; 43:181-188.

- 173 Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J (1995). Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine*;1(2):149-153.
- 174 Wheelock EF, Weinhold KJ, Levich J (1981). The tumor dormant state. *Adv Cancer Res*; 34:107-140.
- 175 Woodruff M (1982). Interaction between cancer and host. The Walter Hubert Lecture. *Brit J Cancer*; 46:313-322.
- 176 Noble RL, Hoover L (1975). A classification of transplantable tumors in NB rats controlled by estrogen from dormancy to autonomy. *Cancer Res*; 35:2935-2941.
- 177 Bauer KH (1963), *Das Krebsproblem*. 2nd ed. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer Verlag.
- 178 Mc Bride CM (1978). The surgeon as oncologist. *South Med J*; 71:1331-1333.
- 179 Weiss L (1990). Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res*; 54:159-211.
- 180 Kell MR, Winter DC, O'Sullivan GC et al. (2000). Biological behaviour and clinical implications of micrometastases. *Br J Surg*; 87:1629-1639.
- 181 Hermanek P, Hutter P, Sobin LH, Wittekind C (1999). Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer*; 86:2668-2673.
- 182 Willeke F, Sturm JW (2001). Minimal residual disease in soft tissue sarcomas. *Semin Surg Oncol*; 20:294-303.
- 183 Shivers SC, Wang X, Li W et al. (1998). Molecular staging of malignant melanoma: correlation with clinical outcome. *JAMA*; 280:1410-1415.
- 184 Izbicki JR, Hosch SB, Passlick B et al (1996). Esophageal cancer: prognostic significance and therapeutic consequences of individual tumor cells in lymph nodes (abstract) *Assoc. of Acad Departments of Surgery 10^o Annual Meeting*: Bern.
- 185 Schlimok G, Funke I, Pantel K et al. (1991). Micrometastatic tumor cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance. *Eur J Cancer*; 27:1461-1465.
- 186 Jauch KW, Heiss MM, Gruetzner KU et al. (1996). Prognostic significance of bone marrow micrometastasis in patients with gastric cancer. *J Clin Oncol*; 14:1810-1817.
- 187 Lindemann F, Schlimock G, Dirschedl P et al. (1992). Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet*; 340 (8821):685-689.

- 188 Weitz J, Kienle P, Magener A et al. (1998). Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*; 4:343-348.
- 189 Rosenberg R, Hoos A, Mueller J, Nekarda H (2000). Impact of cytokeratin 20 and carcinoembryonic antigen mRNA detection by RT-PCR in regional lymph nodes of patients with colorectal cancer. *Brit J Cancer*; 83:1323-1329.
- 190 Fuatamura M, Takagi Y, Koumura H et al. (1998). Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reverse transcriptase polymerase chain reactions for carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20. *J Surg Oncol*; 68:34-40.
- 191 Liefers GJ, Cleton-Janson AM, van de Velde JH et al. (1998). Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med*; 339:223-228.
- 192 Weitz J, Herfarth C (2001). Surgical strategies and minimal residual disease detection. *Semin Surg Oncol*;20:329-333.
- 193 Hermanek P, Wittekind C (1994). Residual tumor (R) tumor classification and prognosis. *Semin Surg Oncol*; 10:12-20.
- 194 Sobin LH, Wittekind C (1997). TNM-classification of malignant tumors. 5th edition, London: John Wiley & Sons, Inc.
- 195 Nishizaki T, Matsumata T, Kanematsu T (1990). Surgical manipulation of VX 2 carcinoma in the rabbit liver evokes enhancement of metastasis. *J Surg Res* ;49:92-97.
- 196 Barnes JP (1952). Physiologic resection of the right colon. *Surg Gynecol Obstet*; 94:722-726.
- 197 Turnbull RB, Kyle K, Watson FR, Spratt J (1967). Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technique on survival rates. *Ann Surg*; 166:420-425.
- 198 Wiggers T, Jeekel J, Arends JW et al. (1994). No-touch isolation techniques in colon cancer: a controlled prospective trial. *Brit J Surg*; 75:409-415.
- 199 Weitz J, Koch M, Kienle P, et al. (2000). Detection of hematogenic tumor cell determination in patients undergoing resection of liver metastases for colorectal cancer. *Ann Surg*; 232:66-72.
- 200 Statistisches Bundesamt W. Statistisches Jahrbuch der Bundesrepublik Deutschland 1994. Wiesbaden: Wiesbadener Graphische Betriebe GMBH 1994.
- 201 Habilitationsarbeit PD Dr. med. W. Schwenk 1997. S. 5 folgende.
- 202 Eriksson T, Björkman S, Roth B, Björk B, Höglund P (1998). Hydroxylated Metabolites of Thalidomide: Formation In-vitro and In-vivo in Man. *J Pharm Pharmacol*; 50:1409-1416.

- 203 Schumacher H, Smith RL, Williams RT (1965a). The metabolism of thalidomide: the spontaneous hydrolysis of thalidomide in solution. *Brit J Pharmacol*; 25:324-337.
- 204 Schumacher H, Smith RL, Williams RT (1965b). The metabolism of thalidomide: the fate of thalidomide and some of its hydrolysis products in various species. *Brit J Pharmacol*; 25:338-351.
- 205 Blaschke G, Hess HR, Lupke NP (1989). Synthese und teratogene Wirkung von N-Hydroxythalidomid. *Arzneim Forsch*;39:293-294.
- 206 Gordon GB, Spielberg SP, Blake DA, Balasubramanian V (1981). Thalidomide teratogenesis: evidence for a toxic arene oxide metabolite. *Proc Natl Acad Sci. USA*;78:2545-2548.
- 207 Schumacher H, Blake D, Gillette JR (1968). Disposition of thalidomide in rabbits and rats. *J Pharmacol Exp Ther*;160:201-211.
- 208 Kotoh T, Dhar DK, Masunaga R et al (1999). Antiangiogenic therapy of human esophageal cancers with thalidomide in nude mice. *Surgery*;125:536-544.
- 209 Wiedemann HR (1961). Hinweis auf eine derzeitige Häufung hypo- und aplastischer Fehlbildung der Gliedmassen. *Med Welt*, 37:1863.
- 210 Mc Bride WG (1961). Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*; 2:1358.
- 211 Lenz W (1962). Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*;1:45.
- 212 Pfeifer RA, Kosenow W. (1962). Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*; 1:45-46.
- 213 Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA*;87:6624-6628.
- 214 Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP (1989). Regulation of the activity of a new angiogenesis inhibitor by a cancer suppressor-gene. *Cell*;56:345-355.
- 215 Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck NP (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*;265:1582-1584.
- 216 Moreira AL, Sampaio EP, Zmudzinas A et al. (1993). Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med*;177:1675-80.
- 217 Moreira AL, Tsenova-Berkova L, Wang J et al. (1997). Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis. *Tubercle Lung Dis* ;78:47-55.

- 218 Partida-Sanchez S, Favila-Castillo L, Pedraza-Sanchez S et al. (1998). IgG antibody subclasses, tumor necrosis factor and IFN-gamma levels in patients with type II lepra reaction on thalidomide treatment. *Int Arch Allergy Immunol*;116:60-66.
- 219 Rowland TL, Mc Hugh SM, Deighton J, et al. (1998). Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacol*;40:11-20.
- 220 Rowland TL, Mc Hugh SM, Deighton J, et al. (1999). Selective down-regulation of T cell- and non-T-cell derived tumor necrosis factor alpha by thalidomide: comparison with dexamethasone. *Immunol Lett*;68:325-332.
- 221 Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R et al. (1991). Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med*;173:699-703.
- 222 Haslett P, Hempstead M, Seidman C et al. (1997). The metabolic and immunologic effects of short-term thalidomide treatment of patients infected with the human immunodeficiency virus. *AIDS Res Hum Retrovir*;13:1047-1054.
- 223 Shannon EJ, Sandoval F. (1995). Thalidomide increases the synthesis of IL-2 in cultures of human mononuclear cells stimulated with Concanavalin A, Staphylococcal enterotoxin A and purified protein derivate. *Immunopharmacol*;31:109-116.
- 224 Mc Hugh SM, Rifkin IR, Deighton J et al. (1995). The immunosuppressive drug thalidomide induces t-helper cell type 2 (Th 2) and concomitantly inhibits Th 1 cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin Exp Immunol*; 99:160-167.
- 225 Moller DR, Wysocka M, Greenlee BM et al. (1997). Inhibition of IL-12 production by thalidomide. *J Immunol*;159:5157-5161.
- 226 Rowland TL, Mc Hugh SM, Deighton J, et al. (1998). Differential regulation by thalidomide and dexamethasone of cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacol*;40:11-20.
- 227 Davies FE, Raje N, Hideshima T et al. (2001). Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*;98:210-216.
- 228 Dimopoulos MA, Zomas A, Viniou NA et al. (2001). Treatment of Waldenström's macroglobulinemia with thalidomide. *J Clin Oncol*;19:3596-3601.

- 229 Raza A, Myer P, Dutt D et al. (2001). Thalidomide produces transfusion independence in long-standing refractory anemias of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*; 98:958-965.
- 230 Fife K, Howard MR, Gracie F, Philipps RH, Bower M. (1998). Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's Sarcoma and correlation with HHV8 titre. *Int J STD AIDS*;9:751-755.
- 231 Little RF, Wyvill KM, Pluda JM et al. (2000). Activity of thalidomide in AIDS-related Kaposi's Sarcoma. *J Clin Oncol*;18:2593-2602.
- 232 Eisen T, Boshoff C, Mak I et al. (2000). Continuous low-dose thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. *Br J Cancer*;82:812-817.
- 233 Baidas SM, Winer EP, Fleming GF et al. (2000). Phase II evaluation of thalidomide in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*;18:2710-2717.
- 234 Metchnikoff E. „Zur Immunitätslehre“. In 11. Deutscher Kongress f. Innere Medizin 1908, Leipzig: 282-289.
- 235 Tyrell J, Silberman H, Chandrasoma P, et al. (1989). Absorbable versus permanent mesh in abdominal operations. *Surg Gynecol Obstet*;168(3):227-232.
- 236 Hendriks JM, Hubens G, Wuyts FL, Vermeulen P, Hubens A, Eyskens E (1999). *Br J Surg*;86(9):1171-5.

Eidesstattliche Versicherung

Gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift