

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

Verhalten endothelialer Progenitorzellen
unter metronomischer Chemotherapie und
intermittierender Stoßtherapie von Zytostatika

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Tanja Trefzer
aus Schopfheim

Lübeck 2010

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Wagner
2. Berichterstatter/-in:	Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Schröer
Tag der mündlichen Prüfung:	20.12.2010
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	20.12.2010

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

– Dekan der Medizinischen Fakultät –

Erklärung

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Berlin den 5. August 2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Angiogenese und Vaskulogenese	1
1.2	Endotheliale Progenitorzellen	2
1.3	Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen anhand von Oberflächenmarkern	3
1.4	Tumorangiogenese	4
1.5	Vascular Endothelial Growth Factor	5
1.6	Bedeutung der EPCs für die Tumervaskularisierung	6
1.7	Therapie maligner Tumoren	7
1.8	Trofosamid	9
1.9	Cyclooxygenase-2-Hemmer	9
1.10	Zielsetzung	11
2	Material & Methoden	12
2.1	Methodenvalidierung	12
2.1.1	Hintergrund	12
2.1.2	Genauigkeit	13
2.1.3	Präzision	13
2.1.4	Ausbeute	13
2.2	Patientengruppen	13
2.2.1	Gruppe I	14
2.2.2	Gruppe II	15
2.2.3	Gruppe III	15
2.2.4	Gruppe IV	15
2.3	Blutentnahmen	15
2.3.1	Gruppe I	16
2.3.2	Gruppe II	16
2.3.3	Gruppe III	16
2.3.4	Gruppe IV	16
2.4	Anreicherung der CD34-positiven Zellen	16
2.5	Durchflusszytometrie	18
2.5.1	Prinzip	18

Inhaltsverzeichnis

2.5.2	Probenverarbeitung	20
2.5.3	Messung	21
2.6	VEGF-Plasmabestimmung	22
2.7	Blutbild	22
2.8	Statistische Auswertung	22
3	Ergebnisse	24
3.1	Methodenvalidierung	24
3.1.1	Präzision	24
3.1.2	Recovery	25
3.2	Anzahl der zirkulierenden EPCs	26
3.2.1	CD144-positive und CD34-positive Zellen	26
3.2.2	VEGF-R2-positive und CD34-positive Zellen	28
3.3	Vergleich der CD34/CD144-positiven und CD34/VEGF-R2-positiven Zellen	30
3.4	CD34-positive Zellen	33
3.5	VEGF-Plasmakonzentration	34
3.6	Blutbild	35
3.6.1	Leukozyten	35
3.6.2	Lymphozyten	36
4	Diskussion	38
5	Zusammenfassung	49
	Literaturverzeichnis	51
A	Präzision	61
B	Patientendaten	62
C	Danksagung	67

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Angiogenese und Vaskulogenese	2
Abb. 2	Selektion der CD34-positiven Zellen	18
Abb. 3	Prinzip der Durchflusszytometrie	20
Abb. 4	Gating-Strategie	21
Abb. 5	Anzahl der zirkulierenden EPCs (CD34/CD144-positiv)	28
Abb. 6	Anzahl der zirkulierenden EPCs (CD34/VEGF-R2-positiv)	30
Abb. 7	Vergleich der zirkulierenden EPCs unter klassischer Chemotherapie	32
Abb. 8	Vergleich der zirkulierenden EPCs unter metronomischer Chemo- therapie	32
Abb. 9	Anzahl der CD34-positiven Zellen/ml Blut	33
Abb. 10	Verlauf der VEGF-Plasmakonzentration	35
Abb. 11	Anzahl der Leukozyten/ μ l Blut	36
Abb. 12	Anzahl der Lymphozyten/ μ l Blut	37

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Patientengruppen	14
Tab. 2	Pipettierschema	20
Tab. 3	Präzisionsbestimmung I	25
Tab. 4	Präzisionsbestimmung II	25
Tab. 5	Bestimmung der Recovery	25
Tab. 6	Messungen zur Präzisionsbestimmung I	61
Tab. 7	Messungen zur Präzisionsbestimmung II	61
Tab. 8	Patientendaten Gruppe I	63
Tab. 9	Patientendaten Gruppe II	64
Tab. 10	Patientendaten Gruppe III	65
Tab. 11	Patientendaten Gruppe IV	66

Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
5-FU	5 - Fluorouracil
aFGF	acidic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CA	Karzinom
CHOP	Chemotherapie-Schema
COX-2	Cyclooxygenase - 2
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPCs	Endotheliale Progenitorzellen
FDA	Food and Drug Association
FEC	Chemotherapie-Schema
G-CSF	Granulocytes - Colony Stimulating Factor
HIF	Hypoxia Inducible Factor
Ig	Immunglobulin
MACS	Magnetic - Cell - Sorting
NHL	Non - Hodgkin - Lymphom
NO	Stickstoffmonoxid
PC-7	Phycoerythrin - Cyanin - 7
PD-ECGF	Platelet Derived - Endothelial Cell Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PG	Prostaglandin
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNS	Ribonukleinsäure
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R2	Vascular Endothelial Growth Factor - Rezeptor 2

1 Einleitung

Krebserkrankungen sind die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Neben den malignen Zellen selbst tritt zunehmend auch das tumoreigene Gefäßsystem in den Fokus der klinischen Forschung. Einige dieser Forschungsergebnisse haben bereits zur Entwicklung neuer Therapien geführt.

1.1 Angiogenese und Vaskulogenese

Wie in Abbildung 1 dargestellt, können Blutgefäße im menschlichen Organismus auf zwei verschiedene Arten entstehen. Neue Blutgefäße können zum einen aus bereits existierenden Gefäßen entstehen. Dazu wandern reife Endothelzellen in Richtung eines Stimulus aus und formieren ein neues Gefäß. Die Endothelzellen lösen dazu zunächst ihre Zell-Zell-Kontakte und bilden Pseudopodien (Ausprossen). Alternativ kann sich auch ein bestehendes Gefäß unterteilen und so zwei neue Gefäße bilden [7, 17]. Als Stimulus hierfür dienen Gefäßschäden, Entzündungen oder auch maligne Tumoren. Alle diese Vorgänge werden unter dem Begriff der Angiogenese zusammengefasst [35]. Blutgefäße können zum anderen auch neu entstehen. Hierbei bilden pluripotente Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zunächst ein einfaches kapillares Netzwerk, aus dem reife Blutgefäße entstehen [32]. Dieser Prozess wird als Vaskulogenese bezeichnet. Beide Vorgänge sind für das Wachstum maligner Tumoren von großer Bedeutung, dies wird näher in den Kapiteln 1.4 und 1.6 erläutert.

Bis im Jahre 1997 ging man davon aus, dass Vaskulogenese nur im embryonalen Organismus existiert. 1997 gelang jedoch Asahara et al. der Nachweis von pluripotenten Stammzellen aus dem Blut eines erwachsenen Menschen, die in vitro unter bestimmten Kulturbedingungen zu Endothelzellen ausdifferenzierten [5]. Dazu isolierten sie CD34-positive Zellen mittels magnetischen Antikörpern aus dem peripheren Blut von erwachsenen Probanden. Anschließend markierten sie die Zellen mit einem fluoreszierenden Stoff und beobachteten ihr Verhalten in der Zellkultur. Nach sieben Tagen konnten erste primitive Netzwerkstrukturen und die Bildung von röhrenartigen Strukturen beobachtet werden. Das gleiche Resultat konnte die Gruppe durch die Isolierung und Kultivierung von Vascular Endothelial Growth Factor - Receptor 2 (VEGF-R2) - positiven Zellen aus peripherem Blut erzielen. In weiteren Untersuchungen der Gruppe wurde der endotheliale Charakter der Zellen bestätigt. So wurden sie durch Kultivierung

mit Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) angeregt. In weiteren präklinischen Modellen konnte die Gruppe zeigen, dass CD34-positive Zellen in vivo zur Vaskularisierung ischämischer Gebiete beitragen. Die Arbeitsgruppe folgerte aus ihren Versuchen, dass CD34-positive oder VEGF-R2-positive Zellen zur Neovaskularisierung in adulten Organismen beitragen und bezeichnete die von ihnen entdeckten Zellen als Progenitor-Endothelzellen.

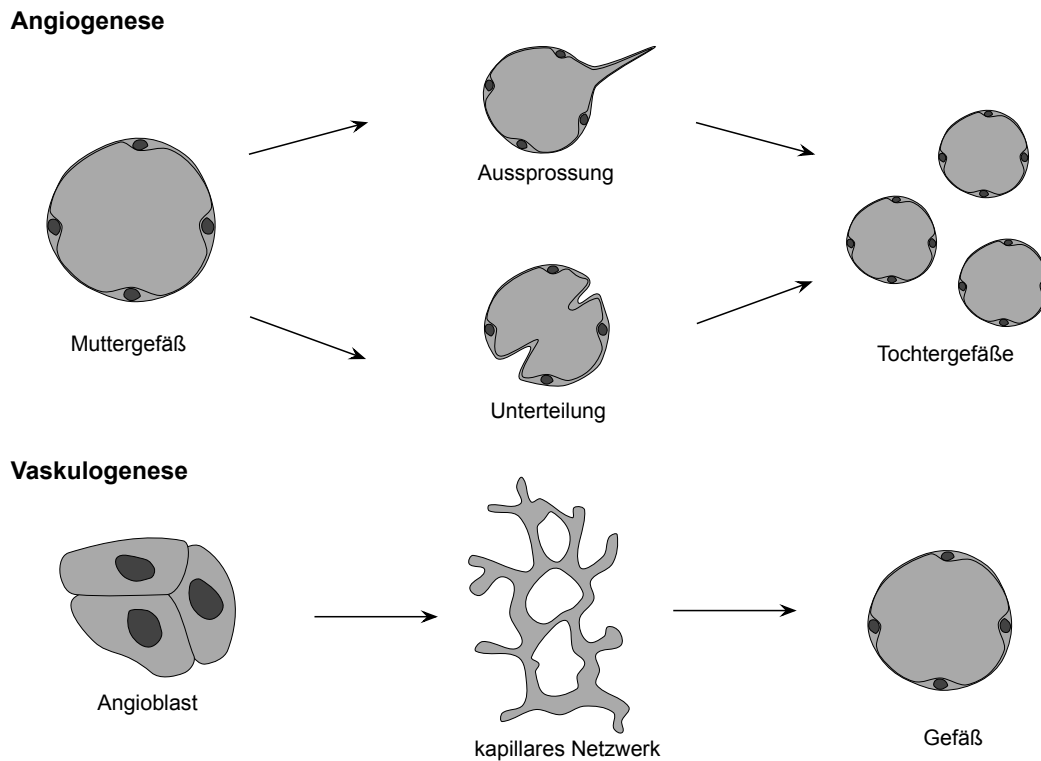


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Angiogenese und Vaskulogenese. Dargestellt ist, wie aus einem Muttergefäß mittels Aussprossung oder durch Unterteilung Tochtergefäße entstehen. Dieser Vorgang wird auch als Angiogenese bezeichnet; als zweiter Vorgang ist die Vaskulogenese dargestellt, dabei entsteht aus einer Vorläuferzelle, dem sogenannten Angioblasten, zunächst ein primitives kapillares Netzwerk. Aus diesem Netzwerk gehen wieder reife Gefäße hervor.

1.2 Endotheliale Progenitorzellen

Für die von Asahara et al. beschriebenen Progenitor-Endothelzellen hat sich in der Literatur der Begriff endotheliale Progenitorzellen (EPCs) durchgesetzt. EPCs finden sich sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut. Die Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark in die Blutbahn wird durch verschiedene Zytokine wie z.B. Granulocytes - Colony Stimulating Factor (G-CSF) oder VEGF gefördert [6, 85]. Im Tierversuch führte die intraperitoneale Applikation von VEGF zu einem deutlichen

Anstieg von EPCs im peripheren Blut von Mäusen [6]. Parallel dazu wurde die Neovaskularisierung in einer dafür präparierte Kornea untersucht. Die erhöhte Konzentration an EPCs führte zu einer vermehrten Neovaskularisierung in diesem Bereich. Die subkutane Applikation von G-CSF führte bei Mäusen ebenfalls zu einer vermehrten Mobilisierung von EPCs ins periphere Blut. Parallel zum Anstieg der EPCs kam es in diesem Ansatz ebenfalls zur vermehrten Neovaskularisierung. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, die lediglich eine Injektion mit Kochsalz erhielten und keine vermehrte Mobilisierung zeigten [85]. Nach ihrer Mobilisierung aus dem Knochenmark ins periphere Blut werden EPCs von verschiedenen Autoren auch als „zirkulierende endotheliale Progenitorzellen“ bezeichnet [78, 88]. EPCs können entweder durch ihr Verhalten in Kultur oder anhand der Expressierung verschiedener Oberflächenmarker definiert werden.

1.3 Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen anhand von Oberflächenmarkern

Die Definition von EPCs anhand der Expressierung bestimmter Oberflächenmarker ist noch nicht abschließend geklärt. Die meisten Studien nutzen eine Kombination aus Markern, die auf Vorläuferzellen zu finden sind (CD34, CD133), und typischen Markern für Endothelzellen (VEGF-R2, CD144).

CD34 ist ein Glykoprotein, das vor allem auf der Oberfläche von hämatopoetischen Progenitorzellen, aber auch auf EPCs gefunden wird [5, 22]. CD34 wird in der klinischen Routine im Rahmen der peripheren Stammzellapherese genutzt. Durch Stimulation mit G-CSF werden die Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert, anhand des CD34-Epitops identifiziert und anschließend konserviert [27]. Mit zunehmender Differenzierung der Stammzellen lässt die Expressierung von CD34 nach, reife Zellen exprimieren diesen Marker nicht mehr [21]. Hierbei bereitet die Differenzierung zwischen stark und schwach exprimierenden Zellen Schwierigkeiten. Auf der Suche nach einem spezifischen Antikörper für Zellen, die CD34 stark exprimieren, wurde CD133 entdeckt [92]. Zunächst nahm man an, dass CD133 nur auf unreifen Progenitorzellen aus dem Knochenmark zu finden ist. Inzwischen gibt es jedoch Hinweise, dass CD133 auch von sogenannten Tumorstammzellen exprimiert wird. Dies sind unreife Zellen, die unter anderem innerhalb eines Hirntumors entdeckt wurden und in reife Tumorzellen ausdifferenzierten [79]. Insbesondere frühe Formen der endothelialen Progenitorzellen im Knochenmark exprimieren CD133. Nach ihrer Mobilisierung ins periphere Blut verlieren die zirkulierenden EPCs diesen Marker [46, 66].

VEGFR-2 ist ein Rezeptor, der vor allem auf Endothelzellen zu finden ist, seine Funktion wird ausführlich in Kapitel 1.5 beschrieben. CD144 wird ebenfalls von Endothelzellen exprimiert und ist an der Organisation von Endothelzellkontakten und der

Kontrolle der Gefäßpermeabilität beteiligt [53]. Durchflusszytometrische Untersuchungen konnten nachweisen, dass CD34/VEGF-R2-positive Zellen zusätzlich auch den Marker CD144 exprimieren [65]. CD144 wird im Verlauf des Reifungsprozesses der EPCs erst zu einem späteren Zeitpunkt als VEGF-R2 exprimiert [9, 66, 69]

Die Versuche von Asahara et al. haben ergeben, dass aus CD34-positiven und VEGF-R2-positiven Zellen aus dem peripheren Blut eines Erwachsenen neue Blutgefäße entstehen können [5]. Diverse klinische Studien nutzten deshalb die Kombination aus CD34-positiven und VEGF-R2-positiven Zellen, um die Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen im peripheren Blut zu bestimmen [31, 37, 73, 90]. So konnte beispielsweise dargestellt werden, dass die Anzahl der zirkulierenden EPCs (CD34-positiv und VEGF-R2-positiv) ein unabhängiger Prediktor für kardiovaskuläre Todesursachen ist [90]. Dazu untersuchte die Gruppe über 500 Patienten, denen anlässlich einer Herzkatheteruntersuchung Blut zur Bestimmung der zirkulierenden EPCs entnommen wurde. Die Patienten wurden für 12 Monate nachbeobachtet und hinsichtlich des Überlebens bzw. der Todesursache untersucht. Je höher die EPC-Spiegel zu Beginn der Studie waren, desto geringer war das Risiko der Patienten, an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben. Eine weitere Studie an 44 Patienten mit koronarer Herzkrankheit, 33 Patienten mit instabiler Angina und 43 Kontrollpatienten konnte ebenfalls zeigen, dass ein niedriger Spiegel an zirkulierenden EPCs mit einem hohen Risiko für das Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses korreliert [73].

Andere Studien definierten EPCs als CD34/CD133/VEGF-R2-positiv. Eine Studie von Igreja et al. an 70 Patienten mit malignen Lymphomen konnte zeigen, dass die Anzahl der CD34/CD133/VEGF-R2-positiven Zellen im Blut vom Erfolg der Therapie beeinflusst wird [48]. Bei Patienten, die auf ihre Therapie ansprachen, kam es zu einem Absinken der EPCs bzw. blieben die Spiegel konstant, bei den übrigen Patienten stieg die Anzahl im Verlauf der Therapie an. Bislang ist jedoch die kulturelle Anzüchtung von Endothelzellen aus CD34/CD133/VEGF-R2-positiven Zellen noch nicht gelungen, CD133 wird als Marker deshalb kontrovers diskutiert [19].

Zirkulierende EPCs sind nur in sehr geringer Anzahl im Blut zu finden. Der Anteil aller CD34-positiven Zellen im peripheren Blut liegt bei gesunden Probanden bei weniger als 1 % der mononukleären Zellen [10]. Der Anteil der CD34-positiven und VEGF-R2-positiven Zellen ist deutlich geringer. Bei Patienten, die eine Mobilisierungstherapie zur Stammzellapherese erhalten, sind ca. 1,4 % der CD34-positiven Zellen zirkulierende EPCs [65].

1.4 Tumorangiogenese

Wie zu Beginn beschrieben, spielt die Fähigkeit zur Bildung neuer Blutgefäße eine große Rolle bei Entstehung und Wachstum von malignen Tumoren. Im Anfangsstadium

können sich maligne Tumoren mittels Diffusion ernähren. Ab einer Größe von 3 - 4 Millimetern sind sie jedoch auf den Aufbau eines eigenen Gefäßsystems angewiesen [33, 41]. Durch die Bildung proangiogenetischer Stoffe kommt es in den umgebenden Gefäßen zunächst zur Gefäßdilatation und einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Dies fördert das Auswandern von Plasmaproteinen, die für die folgenden Endothelzellen eine Matrix bilden. Die Endothelzellen teilen sich und formieren zunächst primitive Gefäßstrukturen. Schließlich werden aus diesen Strukturen reife Gefäßsysteme (vgl. Abb. 1). Folkman et al. bezeichneten diesen Vorgang als „Angiogenic switch“ [34, 35].

Bei der Regulierung der Angiogenese spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Dazu gehören u.a. VEGF, acidic und basic Fibroblast Growth Factor (aFGF, bFGF), platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), aber auch die Prostaglandine E1 und E2. Die Bedeutung von VEGF wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.5 Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF ist ein wichtiger Stimulus der Angio- und Vaskulogenese unter physiologischen wie pathologischen Bedingungen [26, 35]. Die VEGF-Produktion in Endothelzellen wird unter anderem durch Hypoxie angeregt [62]. Die Exposition von Endothelzellen mit einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck führt zur Bindung von Hypoxia Inducible Factor (HIF) an die Promoterregion des Genabschnittes für VEGF. Dies wiederum führt zu einer erhöhten Transkription von VEGF [57]. Im Rahmen des Wachstums maligner Tumoren kommt es immer wieder zu hypoxischen Zuständen, wenn die Tumormasse schneller wächst als das versorgende Gefäßsystem. Insofern ist es von Bedeutung, dass VEGF nicht nur von Endothelzellen ausgeschüttet werden kann, sondern auch von verschiedenen malignen Zelllinien [75, 93].

Die Wirkung von VEGF wird über verschiedene Tyrosinkinaserezeptoren übertragen, einer davon ist VEGF-Rezeptor 2 (VEGF-R2). VEGF-R2 wird vor allem von hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen exprimiert, aber auch von malignen Zellen [25]. Die Bindung von VEGF an VEGF-R2 führt zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade. Die Bindung von VEGF bewirkt zunächst die Dimerisierung des Rezeptors. Dadurch wird eine Kinase aktiviert, die die Autophosphorylierung des Rezeptors katalysiert. Infolgedessen werden verschiedene intrazelluläre Enzyme phosphoryliert. Diese beeinflussen die Migration, Proliferation und Differenzierung reifer Endothelzellen sowie die Gefäßpermeabilität und Vasodilatation [2, 11, 39, 40, 60].

Im Rahmen der Vaskularisierung maligner Tumoren fördert VEGF den Aufbau des tumoreigenen Gefäßsystems [23]. VEGF spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Metastasierung, da es das Adhäsions- und Migrationsverhalten von Tumorzellen beeinflusst und die lymphatische Metastasierung begünstigt [20, 45].

VEGF fördert außerdem die Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark: Asahara

et al. konnten im Tiermodell darlegen, dass nach intraperitonealer Applikation von VEGF die Anzahl der zirkulierenden EPCs im Blut signifikant zunimmt [6]. Hattori et al. konnten im Tierversuch durch die systemische Applikation von VEGF ebenfalls eine Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark in die Blutbahn erreichen [42]. In einer weiteren Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass durch die lokale Applikation von VEGF vermehrt EPCs durch den Tumor rekrutiert werden [55].

Bislang gibt es nur wenige klinische Studien hinsichtlich der Relevanz erhöhter VEGF-Plasmaspiegel bei Patienten mit malignen Erkrankungen. Salven et al. untersuchten 200 Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen. Hatten diese bei Diagnosestellung einen sehr hohen VEGF-Spiegel, so betrug die 5-Jahres Überlebensrate 31%. Bei Patienten mit niedrigen Spiegeln lag die Rate bei 61%. Ein erhöhter VEGF-Plasmaspiegel in Kombination mit einem erhöhten basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) konnte als unabhängiger Prediktor für eine schlechte Prognose identifiziert werden [72].

1.6 Bedeutung der EPCs für die Tumervaskularisierung

Die Rolle der EPCs in Bezug auf die Vaskularisierung maligner Tumoren ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Wie bereits im Kapitel 1.4 erläutert, sind maligne Tumoren darauf angewiesen, ein eigenes Gefäßsystem aufzubauen. Neben den bereits erläuterten Mechanismen scheinen auch EPCs zur Tumervaskularisierung beizutragen. Verschiedene Studien stützen diese Hypothese. So konnten in unterschiedlichen Tierversuchen Zellen aus dem Knochenmark im Gefäßnetz des malignen Tumors nachgewiesen werden. Je nach Studie betrug der Anteil weniger als 0,5 % bis hin zu mehr als 60 % [58, 81, 82]. Insbesondere Studien, bei denen der Anteil an EPCs innerhalb des tumoreigenen Gefäßsystems sehr gering war, stellen die Relevanz zirkulierender EPCs für die Tumervaskularisierung in Frage [58].

Tierversuche weisen darauf hin, dass die Art der Chemotherapie einen Einfluss auf die Anzahl der zirkulierenden EPCs hat [12]. Bertolini et al. untersuchten Mäuse, die zuvor mit Lymphomen infiziert wurden. Anschließend erhielten die Tiere entweder eine intermittierende Stoßtherapie mit Cyclophosphamid, eine metronomische Therapie mit Cyclophosphamid (d.h. die kontinuierliche Verabreichung in niedrigen Dosierungen) oder keine Therapie. In allen Gruppen wurde das Tumorstadium täglich untersucht und zum Abschluss der Studie die Anzahl der zirkulierenden EPCs bestimmt. Als Kontrolle dienten tumorfreie Mäuse. Unter intermittierender Stoßtherapie mit Cyclophosphamid kam es zu einer deutlichen Mobilisierung der zirkulierenden EPCs und zu einem verstärkten Tumorstadium. Dabei waren die EPC-Spiegel in Mäusen, die keine Therapie erhielten, geringer, obwohl der Tumor bereits über ein größeres Volumen

verfügte. Unter metronomischer Therapie hingegen nahm die Zahl der zirkulierenden EPCs deutlich ab und das Tumorwachstum wurde verzögert. Die kumulative Dosis war unter metronomischer Chemotherapie höher als unter intermittierender Stoßtherapie. Da bei der intermittierenden Stoßtherapie pro Zyklus die maximal tolerable Dosis verabreicht wird, kann die kumulative Dosis nicht erhöht werden. Erst durch die Verteilung der Dosis auf mehrere Einzelgaben können insgesamt höhere Dosen verabreicht werden. Möglicherweise war die höhere kumulative Dosis eine Ursache für das bessere Ansprechen auf die metronomische Therapie.

1.7 Therapie maligner Tumoren

Die Therapie maligner Tumoren hat zum Ziel, möglichst alle malignen Zellen zu eliminieren. Dabei kommen verschiedene Therapieoptionen zum Einsatz, wie z.B. operative Verfahren, Strahlentherapie und die medikamentöse Therapie. Meist werden die verschiedenen Therapieoptionen miteinander kombiniert. In diesem Kapitel soll insbesondere die medikamentöse Therapie näher beschrieben werden.

Primäres Kennzeichen maligner Zellen ist deren unkontrolliertes Wachstum. Ansatzpunkt vieler Chemotherapeutika ist deshalb der Zellzyklus. So werden die Stoffe beispielsweise als Antimetabolite in die Desoxyribonukleinsäure (DNS) oder Ribonukleinsäure (RNS) eingebaut und führen zum Strangabbruch oder zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese. Eine solche Therapie schädigt jedoch auch Körperzellen, die ebenfalls eine hohe Teilungsrate aufweisen, wie z.B. Zellen des Knochenmarks und der Darmschleimhaut, woraus sich die typischen Nebenwirkungen einer Chemotherapie ergeben. Diese Nebenwirkungen sind dosislimitierend. Die Dosis bei der dies auftritt, wird auch als maximal tolerierte Dosis bezeichnet.

In der Praxis hat sich die Kombination von verschiedenen Chemotherapeutika als sinnvoll erwiesen. Dabei sollten die Stoffe möglichst unterschiedliche Ansatzpunkte aufweisen, um eine synergistische Wirkung zu erzielen. Idealerweise sollten die einzelnen Stoffe unterschiedliche dosislimitierende Wirkungen besitzen, um die Toxizität bei gemeinsamer Verabreichung nicht weiter zu steigern. Durch die Kombination von verschiedenen Substanzen wird außerdem das Risiko für die Entwicklung resistenter Klone gemindert, da die malignen Zellen meist für eine der verwendeten Substanzen noch sensibel sind und durch diese Substanz eliminiert werden.

Diese Regeln kommen beispielsweise bei dem sogenannten CHOP-Schema zur Anwendung. Es wird bei der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt. CHOP setzt sich aus den Stoffen **C**yclophosphamid, **H**ydroxyldaunorubicin (alternative Bezeichnungen: Adriamycin oder Doxorubicin), **O**ncovin[®] (Wirkstoff: Vincristin) und **P**rednisolon zusammen. Cyclophosphamid gehört zur Gruppe der Alkylantien. Durch die Übertragung von Alkylgruppen auf die DNS kommt es zu Einzel- und Doppel-

1 Einleitung

strangabbrüchen und zu fehlerhaften Vernetzungen der Stränge untereinander bzw. zwischen DNS und Proteinen. Adriamycin gehört zur Gruppe der Anthrazykline und ist ein DNS-Interkalator, d.h. es lagert sich zwischen den Nukleinbasen der DNS ein. Dadurch wird die Transkription und DNS-Replikation verhindert. Vincristin gehört zur Gruppe der Vinka-Alkaloide und wirkt als Mitosehemmer. Es bindet an mikrotubuläre Proteine und verhindert infolgedessen die Spindelformation der Zelle. Dadurch arretiert die Mitose in der G2- und M-Phase.

Eine weitere Kombinationstherapie ist das FEC-Schema, welches als adjuvanter Ansatz, d.h. nach erfolgter Operation, bei Patienten mit Mammakarzinom (CA) angewandt wird. Das Schema beinhaltet die Stoffe 5-Fluorouracil (5-FU), Epirubicin und Cyclophosphamid. 5-FU ist ein sogenannter Antimetabolit und hemmt durch Einbau in die RNS die Proteinsynthese. Seine Metaboliten werden außerdem als falsche Nukleotide in die DNS eingebaut und führen zu Strangabbrüchen. Epirubicin gehört zur zweiten Generation der Anthrazykline und ähnelt im Wirkmechanismus Adriamycin. Aufgrund der dosislimitierenden Wirkung wird eine Stoßtherapie mit Zytostatika in den meisten Fällen alle zwei bis drei Wochen verabreicht, nachdem unter anderem die Regeneration des Knochenmarks beobachtet wurde. Diese Art der Therapie wird im weiteren Verlauf der Arbeit als klassische Chemotherapie bezeichnet.

Wird eine klassische Chemotherapie aufgrund von Nebenwirkungen oder eines reduzierten Allgemeinzustandes nicht mehr toleriert, kommt alternativ eine metronomische Therapie zum Einsatz. Darunter versteht man die kontinuierliche, meist tägliche Applikation eines Chemotherapeutikums. Diese Art von Therapie zielt nicht nur auf direkte Schädigung der malignen Zellen durch Chemotherapeutika, sondern hemmt zusätzlich das Gefäßsystem des Tumors. Browder et al. konnten im Tiermodell zeigen, dass unter metronomischer Therapie mit Cyclophosphamid zunächst Endothelzellen innerhalb des tumoreigenen Gefäßsystems apoptotisch wurden [15]. Dadurch wurde die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen unterbrochen. Im nächsten Schritt kam es zur Apoptose der Tumorzellen selbst. Bemerkenswert war außerdem, dass die Therapie in metronomischer Dosierung selbst bei resistenten Klonen noch wirksam war [15]. Diese Beobachtung konnte durch weitere Tierversuche bestätigt werden [50]. Unsere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls im Tiermodell darstellen, dass unter metronomischer Therapie das Tumorwachstum deutlich verlangsamt wurde und gleichzeitig eine Abnahme der Gefäßdichte innerhalb des Tumors zu beobachten war [51].

Ebenfalls im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass unter metronomischer Therapie die zirkulierenden EPCs absinken [12]. Bertolini et al. untersuchten Mäuse, denen zuvor humane Lymphome implantiert wurden. Diese erhielten eine metronomische Therapie mit Cyclophosphamid als intramuskuläres Depot oder über das Trinkwasser. Unter dieser Therapie kam es zu einem Absinken der zirkulierenden EPCs sowie zu

einem verminderten Tumorwachstum.

In klinischen Studien konnten ebenfalls Erfolge durch eine metronomische Therapie erzielt werden. Bei bereits mehrfach vorththerapierten Patienten kam es unter metronomischer Therapie zu einer (partiellen) Remission oder einer Stabilisierung der Krankheit im aktuellen Stadium (Stable Disease) [24]. Der Begriff „Stable Disease“ beschreibt das Verharren einer Tumorerkrankung im gleichen Stadium über einen längeren Zeitraum, d.h. ohne weiteres Fortschreiten der Erkrankung.

Die Vorteile einer metronomischen Therapie sind eine geringere Rate an Nebenwirkungen sowie die verminderte Entwicklung von Resistenzen gegenüber den verwendeten Substanzen [14]. Häufig können unter metronomischer Therapie höhere kumulative Dosen erreicht werden, als es durch die einmalige Applikation innerhalb eines Zyklus möglich ist. In Deutschland wird unter anderem Trofosfamid (Ixoten[®]) oral als metronomische Therapie eingesetzt.

1.8 Trofosfamid

Trofosfamid ist wie Cyclophosphamid ein Oxazaphosphorin. Trofosfamid wird im Gegensatz zu Cyclophosphamid oral besser resorbiert, da es über eine zusätzliche Chlorethyl-Gruppe verfügt, die seine Lipid-Löslichkeit erhöht. Trofosfamid gehört wie Cyclophosphamid zu den Alkylantien, es bewirkt ebenfalls durch Übertragung von Alkylgruppen Strangabbrüche der DNS. Trofosfamid wird je nach Verträglichkeit in Dosierungen von 50 - 150 mg täglich verabreicht. Trofosfamid hatte früher eine breite Zulassung für lymphoretikuläre Tumoren, Hämoblastosen und solide Tumoren. Seit der Nachzulassung ist Trofosfamid derzeit nur noch zur Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen nach Versagen der Standardtherapie zugelassen. In der Praxis wird es weiterhin zur Therapie solider Tumoren eingesetzt.

Trofosfamid wurde im Rahmen von Studien unter anderem bei Patienten mit Lymphomen, Pankreaskarzinomen oder Sarkomen getestet [13, 52, 74]. Trofosfamid zeichnete sich durch eine gute Verträglichkeit aus. Klinisch konnte ein Fortschreiten der Grunderkrankung bei vielen Patienten verhindert werden.

1.9 Cyclooxygenase-2-Hemmer

In der klinischen Praxis wird eine metronomische Therapie mit einem Cyclooxygenase-2 (Cox-2)-Hemmer kombiniert. Cox-2 ist ein Enzym, das im Arachidonsäurezyklus an der Bildung von Prostaglandinen (PG) beteiligt ist. Eines dieser Prostaglandine ist PG E₂, das eine wichtige Rolle bei der Produktion angiogenetischer Stoffe zu spielen scheint und von verschiedenen Autoren selbst als ein wichtiger Mediator der Tumorangiogenese

1 Einleitung

angesehen wird [36, 54, 86]. In Zellen mit erhöhter Cox-2-Exprimierung wurden neben PG E₂ auch VEGF und bFGF überexprimiert [86].

Cox-2 wird u.a. in Endothelzellen als Reaktion auf Entzündung und Zellaktivierung exprimiert [49]. Cox-2 wird jedoch nicht nur von Endothelzellen, sondern auch von verschiedenen humanen Tumorzelllinien exprimiert. Dazu gehören beispielsweise Kolon-, Prostata-, Bronchial- und Mammakarzinome [59, 94]. Das Enzym wird nicht nur von den malignen Zellen selbst exprimiert, sondern auch vom Gefäßsystem des Tumors. Das gesunde umgebende Gewebe weist dagegen keine Exprimierung auf. In einigen Tumoren ist Cox-2 sogar nur im Gefäßsystem des Tumors nachzuweisen [54]. Cyclooxygenase-2 scheint somit ein idealer Ansatzpunkt für eine Chemotherapie zu sein, da durch die Hemmung lediglich das maligne Gewebe und das dazugehörige Gefäßsystem geschädigt werden [59].

Seit Einführung der Cox-2-Hemmer, zunächst in die Schmerztherapie, stehen mit dieser Gruppe Medikamente zur Verfügung, um selektiv die Cyclooxygenase-2 zu hemmen und damit die Produktion von Prostaglandinen und proangiogenetischen Stoffen zu hemmen. Cox-2-Hemmer beeinflussen, ähnlich wie eine metronomische Therapie, die Proliferation und Apoptose von Endothelzellen [54, 80]. Auch EPCs werden durch Cox-2-Hemmer beeinflusst: in vitro konnte gezeigt werden, dass die Exposition mit einem Cox-2-Hemmer zu einer verminderten Proliferation von EPCs führte [25].

Erste Tierversuche lieferten viel versprechende Ergebnisse, da durch die alleinige Therapie mit einem Cox-2-Hemmer das Tumorwachstum stärker verzögert werden konnte als durch eine Therapie mit Cyclophosphamid [59]. Der Erfolg einer solchen Therapie wurde unter anderem darauf zurückgeführt, dass neben den malignen Zellen selbst auch deren Versorgungssystem zerstört wird.

In der Klinik werden Cox-2-Hemmer bereits zur Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt. Verschiedene Studien konnten insbesondere bei mehrfach vorthapierten Patienten mit malignen Melanomen oder Lymphomen Erfolge erzielen. Bei diesen Patienten kam es unter metronomischer Therapie und der zusätzlichen Gabe eines Cox-2-Hemmers zu einer partiellen Remission oder einer Stabilisierung der Krankheit im Sinne einer Stable Disease [16, 43, 44, 80].

Bislang gibt es jedoch nur wenige Studien, die eine metronomische Therapie mit einer metronomischen Therapie in Kombination mit einem Cox-2-Hemmer vergleichen. Eine Studie aus dem Jahr 2007 untersuchte 74 Patienten mit malignen Melanomen. Die Patienten wurden in zwei Therapiearme randomisiert. Gruppe A erhielt eine metronomische Therapie, Gruppe B die gleiche metronomische Therapie in Kombination mit einem Cox-2-Hemmer sowie Pioglitazon. Bei Patienten der Gruppe B war die Zeit bis zum Fortschreiten der Krankheit deutlich länger als in der Vergleichsgruppe. Die Autoren führten dies auf die Unterdrückung der Entzündungsreaktion durch die

zusätzliche Gabe eines Cox-2-Hemmers und Pioglitazon zurück [68]. Unklar bleibt jedoch, welchen Einfluss hierbei Pioglitazon auf das Studienergebnis hatte. Bislang gibt es keine klinische Studie, die eine metronomische Therapie mit und ohne zusätzliche Gabe eines Cox-2-Hemmers miteinander vergleicht.

1.10 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, wie sich die Anzahl der zirkulierenden EPCs unter metronomischer und klassischer Chemotherapie beim Menschen verhält. Bislang gab es lediglich Hinweise aus Tierversuchen, die nahelegen, dass sich EPCs unter klassischer und metronomischer Therapie unterschiedlich verhalten [12]. Zusätzlich sollte der VEGF-Plasmaspiegel gemessen werden.

Insgesamt wurden vier Patientengruppen eingeschlossen:

- Gruppe I: klassische Chemotherapie nach dem FEC-Schema
- Gruppe II: klassische Chemotherapie nach dem CHOP-Schema in Kombination mit dem CD20-Antikörper Rituximab
- Gruppe III: tägliche metronomische Therapie mit Trofosamid
- Gruppe IV: tägliche metronomische Therapie mit Trofosamid und dem Cox-2-Hemmer Celecoxib

Folgende Fragestellungen sollten geklärt werden:

1. Haben klassische und metronomische Chemotherapie unterschiedliche Effekte auf die Anzahl der zirkulierenden EPCs?
2. Wie verhalten sich CD34/CD144-positive Zellen im Vergleich zu CD34/VEGF-R2-positiven Zellen?
3. Wie verhält sich die VEGF-Plasmakonzentration unter den beiden Therapien?
4. Ist der Verlauf der zirkulierenden EPCs analog zum Verlauf der Leukozyten, Lymphozyten und CD34-positiven Zellen?

2 Material & Methoden

Die hier vorliegende Studie untersucht den Einfluss von klassischer Chemotherapie und metronomischer Chemotherapie auf die Anzahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (EPCs) und den VEGF-Plasmaspiegel im menschlichen Organismus.

2.1 Methodenvalidierung

2.1.1 Hintergrund

Die hier verwendeten Methoden zur Bestimmung der Anzahl der zirkulierenden EPCs wurden in der dargestellten Form bislang noch nicht beschrieben. Aus diesem Grund erfolgte im Vorfeld zunächst die Validierung der Methode. Als Grundlage dienten die industriellen Richtlinien zur bioanalytischen Methodenvalidierung der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde, der Food and Drug Association (FDA). Die Richtlinien geben allgemeine Hinweise zur Methodenvalidierung und sollten an den eigenen Versuchsaufbau angepasst werden. Primär wurden diese Richtlinien für Untersuchungen im Bereich der Pharmakologie entwickelt, die in der klinischen Routine angewendet werden. Gegenstand der Validierung sind Untersuchungen zur Genauigkeit, Präzision sowie Ausbeute der Methode.

Als Genauigkeit (accuracy) bezeichnet man die Abweichung des Mittelwertes einer Messreihe vom eigentlichen Wert des Analyten. Hierzu werden wiederholte Messungen einer Probe vorgenommen, deren Konzentration bekannt ist. Die Messungen werden in drei verschiedenen Konzentrationen mit mindestens fünf Bestimmungen der selben Probe durchgeführt. Die Abweichungen sollten im Bereich der unteren Detektionsgrenze nicht mehr als 20 % betragen.

Zur Bestimmung der Präzision (precision) einer Methode wird die zu analysierende Substanz zunächst in Aliquots aufgeteilt, die dann getrennt analysiert werden. Aus den Ergebnissen wird anschließend der Variationskoeffizient berechnet. Im unteren Detektionsbereich sind Werte bis 20 % zulässig.

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Recovery (Ausbeute) einer Messung. Sie gibt an, welcher Anteil des in einer Probe vorhandenen Metaboliten durch die Messung erkannt wird. Dabei muss die Ausbeute nicht 100 % betragen, Verluste sollten jedoch reproduzierbar sein.

2.1.2 Genauigkeit

Die Bestimmung der Genauigkeit konnte nicht durchgeführt werden, da es bislang keine Proben mit bekannter Anzahl an zirkulierenden EPCs gibt.

2.1.3 Präzision

Zur Ermittlung der Präzision wurden zunächst Messungen an sechs gesunden Probanden vorgenommen. Dazu wurden den Probanden insgesamt fünf Blutröhrchen entnommen und jedes einzelne wie unter 2.4 und 2.5.2 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde aus den Ergebnissen der Einzelmessungen der Variationskoeffizient bestimmt.

Bei gesunden Probanden liegen zumeist sehr niedrige Spiegel an zirkulierenden EPCs vor [65]. Deshalb wurden die gleichen Messungen mit dem Blut von sechs Patienten durchgeführt, die zum Zeitpunkt der Blutentnahmen eine Mobilisierungstherapie zur Stammzellapherese erhielten. In diesem Ansatz wurden die entnommenen Proben zunächst vermischt und dann für die weitere Verarbeitung in fünf Aliquots aufgeteilt. Im Anschluss wurde ebenfalls der Variationskoeffizient aus den einzelnen Ergebnissen berechnet.

2.1.4 Ausbeute

Um die Ausbeute (Recovery) zu bestimmen, fehlte ebenfalls ein Standard mit bekannter Konzentration. Im Versuchsaufbau gibt es einen Schritt, bei dem ebenfalls die Ausbeute von großer Bedeutung ist. Im Rahmen der Probenverarbeitung findet eine Selektionierung und Anreicherung der CD34-positiven Zellen statt (s. hierzu Kapitel 2.4). Kritisch zu sehen ist hierbei der Verlust erwünschter Zellen. Im Idealfall werden alle CD34-positiven Zellen selektioniert, in der Negativfraktion sollten deshalb keine oder nur sehr wenige CD34-positive Zellen gefunden werden. Zur Bestimmung der Ausbeute wurde deshalb die Anzahl der CD34-positiven Zellen in der Negativfraktion gemessen. Anschließend wurde der Anteil der CD34-positiven Zellen in der Negativfraktion berechnet.

2.2 Patientengruppen

Die Studie wurde als begleitende Untersuchung im Rahmen einer vom behandelnden Arzt verordneten Chemotherapie durchgeführt. Auf die Indikationsstellung und die Art der Behandlung hatte die Studie keinen Einfluss. Die Studie wurde am 23.05.2005 von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Nr. 05063).

Die Datenerhebung fand von Juni 2005 bis August 2006 statt. Insgesamt wurden 42 Patienten in die Studie eingeschlossen. Anhand der verabreichten Therapie erfolgte

die Einteilung in vier verschiedene Gruppen. 24 Patienten in den Gruppen I und II erhielten eine klassische Chemotherapie, die Gruppen III und IV (n=18) erhielten eine metronomische Chemotherapie mit Trofosfamid. Gruppe IV erhielt zusätzlich den Cyclooxygenase(Cox)-2-Hemmer Celecoxib (Celebrex[®]). Eine Übersicht zu den Patientengruppen findet sich in Tabelle 1. Die demographischen Daten der einzelnen Patienten sowie Daten zu ihrer Erkrankung und der verabreichten Therapie sind in den Tabellen 8 – 11 im Anhang B dargestellt.

Eingeschlossen wurden Patienten über 18 Jahren, die ihr schriftliches Einverständnis gegeben hatten und eine der vier oben beschriebenen Therapien erhielten. Im Rahmen der Studie stand die verabreichte Therapie im Vordergrund, nicht jedoch die zugrundeliegende Erkrankung. Als Ausschlusskriterium galt eine Therapie mit Erythropoietin sowie eine Chemotherapie innerhalb der letzten drei Wochen vor Studienbeginn. Dadurch sollten mögliche Effekte durch eine vorhergehende Therapie ausgeschlossen werden.

Tabelle 1: *Verteilung von Alter ($\pm$ Standardabweichung), Geschlecht und Tumorentität in den vier Patientengruppen: Gruppe I und II erhielten eine klassische Chemotherapie, Gruppe III und IV eine niedrigdosierte, tägliche, orale Chemotherapie mit Trofosfamid, Gruppe IV in Kombination mit Celecoxib. NHL = Non-Hodgkin-Lymphom, CA = Karzinom*

Gruppe	Alter	♂	♀	Diagnose
I	58,9 $\pm$ 12,0	-	14	Mamma-CA (n=14)
II	67,6 $\pm$ 8,59	6	4	NHL (n=10)
III	62,6 $\pm$ 11,7	4	6	Bronchial-CA (n=2), Mamma-CA (n=2), Sarkom (n=2), Kolorektales-CA (n=3), Andere (n=1),
IV	61,4 $\pm$ 11,2	3	5	Bronchial-CA (n=2), Kolon-CA (n=2), oropharyngeales Plattenepithel-CA (n=2), Andere (n=2)

2.2.1 Gruppe I

Gruppe I setzte sich aus 14 weiblichen Patienten zusammen, die eine adjuvante Chemotherapie aufgrund eines primären Mammakarzinoms erhielten. Bei einer Patientin lag ein beidseitiges Mamma-CA vor, bei einer anderen ein Rezidiv in der Axilla. Eingeschlossen wurden lediglich Patientinnen, die den ersten Zyklus ihrer Therapie nach dem FEC-Schema erhielten. Die Therapie setzt sich aus den Stoffen Fluorouracil (5-FU), Epirubicin und Cyclophosphamid zusammen. Der Wirkmechanismus der jeweiligen Stoffe wird in Kapitel 1.7 näher beschrieben.

2.2.2 Gruppe II

Gruppe II bestand aus zehn Patienten (vier weiblich, sechs männlich), die aufgrund eines Non-Hodgkin-Lymphoms eine Chemotherapie nach dem CHOP-Schema in Kombination mit dem CD20-Antikörper Rituximab erhielten. Eingeschlossen wurden lediglich Patienten, die den ersten Zyklus CHOP erhielten. Das Schema beinhaltet die Stoffe Cyclophosphamid, **H**ydroxyldaunorubicin (alternative Bezeichnungen: Adriamycin, Doxorubicin), **O**ncovin[®] (Wirkstoff: Vincristin) und **P**rednisolon. Der Wirkmechanismus der einzelnen Stoffe wird in Kapitel 1.7 beschrieben. Rituximab ist ein gentechnisch hergestellter monoklonaler Antikörper gegen das CD20 Antigen von B-Lymphozyten.

2.2.3 Gruppe III

Gruppe III setzte sich aus zehn Patienten (sechs weiblich, vier männlich) zusammen, die eine tägliche, orale Therapie mit Trofosamid (100 oder 150 mg/Tag) erhielten. Trofosamid wird genauer in Kapitel 1.8 beschrieben. Kumulativ ergibt sich daraus für den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen eine Dosis von 2100 mg (n=7) bzw. 3150 mg (n=3).

2.2.4 Gruppe IV

Gruppe IV bestand aus acht Patienten (fünf weiblich, drei männlich), die eine tägliche, orale Therapie mit Trofosamid (100 oder 150 mg/Tag) erhielten. Kumulativ wurden während des Beobachtungszeitraumes von drei Wochen insgesamt 2100 mg (n = 5) bzw. 3150 mg (n = 3) Trofosamid eingenommen. Zusätzlich erhielten die Patienten den Cox-2-Inhibitor Celecoxib in einer Dosierung von 400 mg täglich. In einem Fall wurden aufgrund von kardiovaskulären Vorerkrankungen nur 200 mg verschrieben. Der Wirkungsmechanismus von Cox-2-Hemmern wird ausführlich in Kapitel 1.9 beschrieben.

2.3 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen erfolgten nach gegebenen klinischen Standards. Die Entnahmezeitpunkte für die Studie wurden so gewählt, dass diese parallel zu den Routineentnahmen zwecks Therapiekontrolle erfolgten. Dadurch wurde die zusätzliche Belastung der beteiligten Patienten reduziert. Als Entnahmegefäß wurde eine Monovette der Firma Sarstedt gewählt, die mit einem speziellen Citrat-Puffer befüllt war, da die Proben unter diesen Bedingungen eine höhere Stabilität aufwiesen. Bis zur Verarbeitung wurden die Proben unter Bewegung gelagert. Die maximale Lagerungszeit betrug sechs Stunden.

2.3.1 Gruppe I

Die Blutentnahmen bei Gruppe I erfolgten direkt vor Verabreichung des 1. Zyklus sowie zehn Tage nach Chemotherapie – analog zum erwarteten Nadir der Leukozyten. Die dritte und letzte Entnahme erfolgte nach 21 Tagen, unabhängig davon, ob der 2. Zyklus nach 21 Tagen verabreicht oder aus klinischen Aspekten verschoben wurde.

2.3.2 Gruppe II

Die Blutentnahmen bei Gruppe II erfolgten direkt vor Verabreichung des 1. Zyklus bzw. im Falle einer Vorphase mit Vincristin bereits vor Beginn der Vorphase. Die weiteren Entnahmen erfolgten an Tag 10 nach Beginn des 1. Zyklus, parallel zum erwarteten Leukozytennadir sowie an Tag 21. Wurde der 2. Zyklus aufgrund klinischer Aspekte verschoben, so erfolgte die Entnahme dennoch an Tag 21 nach dem ersten Zyklus CHOP. Ein Patient erhielt eine Therapie nach dem CHOP-14 Schema, bei dem alle 14 Tage ein Zyklus verabreicht wird, hier erfolgte die 3. Entnahme nach 14 Tagen.

2.3.3 Gruppe III

Die erste Blutentnahme bei Gruppe III erfolgte vor Therapiebeginn. Die weiteren Blutentnahmen erfolgten analog zu den zuvor beschriebenen Gruppen an den Tagen 10 und 21 der Therapie.

2.3.4 Gruppe IV

Die erste Blutentnahme bei Gruppe IV erfolgte analog zu denen der Gruppe III vor Beginn der Therapie. Die weiteren Blutentnahmen fanden an den Tagen 10 und 21 statt.

2.4 Anreicherung der CD34-positiven Zellen

EPCs gehören zu den CD34-positiven Zellen. Der Anteil CD34-positiver Zellen im Blut gesunder Probanden beträgt weniger als 1 % der mononukleären Zellen, deshalb wurde zunächst eine Selektion der CD34-positiven Zellen vorgenommen [10]. Die Aufreinigung erfolgte mittels MiniMACS-Säulen und dem CD34-Progenitor-Cell-Isolation-Kit der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland).

Zu Beginn wurde ein Milliliter Vollblut mit jeweils 100 μl Blockingreagenz und einem speziellen Antikörper versetzt. Dieser Antikörper besteht aus zwei Anteilen, einem Epitop, das gegen das CD34-Antigen gerichtet ist sowie einem magnetischen Mikropartikel. Zu allen drei Messzeitpunkten wurden für jeden Patienten zwei Proben à 1 ml Vollblut sowie eine weitere Probe à 500 μl vorbereitet. Die Probe aus 500 μl Vollblut

2 Material & Methoden

diente später als Isotypenkontrolle. Die so vorbereiteten Proben wurden für 30 Minuten im Dunkeln gelagert. Während dieser Zeit konnten die Antikörper mit den CD34-positiven Zellen eine Bindung eingehen. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert und der Plasmaüberstand inklusive der ungebundenen Antikörper verworfen. Die verbleibenden zellulären Bestandteile wurden in 1,5 ml Magnetic-Cell-Sorting (MACS) - Puffer gelöst. Der MACS-Puffer bestand aus phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS), die mit 0,5 % Rinderalbumin (Bovine Serum Albumin, BSA) und 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) versetzt wurde. Der Puffer wurde nach seiner Zubereitung steril filtriert. Die so suspendierten Zellen wurden auf spezielle Säulen aufgetragen, die sich in einem magnetischen Feld befanden, vergleiche auch Abbildung 2. Jeder Probenansatz wurde jeweils auf eine Säule aufgetragen. Alle Zellen, die das CD34-Antigen exprimierten, konnten während des Inkubationsschritts die magnetischen Antikörper binden und wurden dadurch anschließend im Magnetfeld der Säule zurückgehalten. Die Säulen wurden dreimal mit jeweils einem Milliliter MACS-Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen und die Zellen schließlich mit 300 μ l MACS-Puffer und Druck aus der Säule gelöst und in einem Probengefäß aufgefangen.

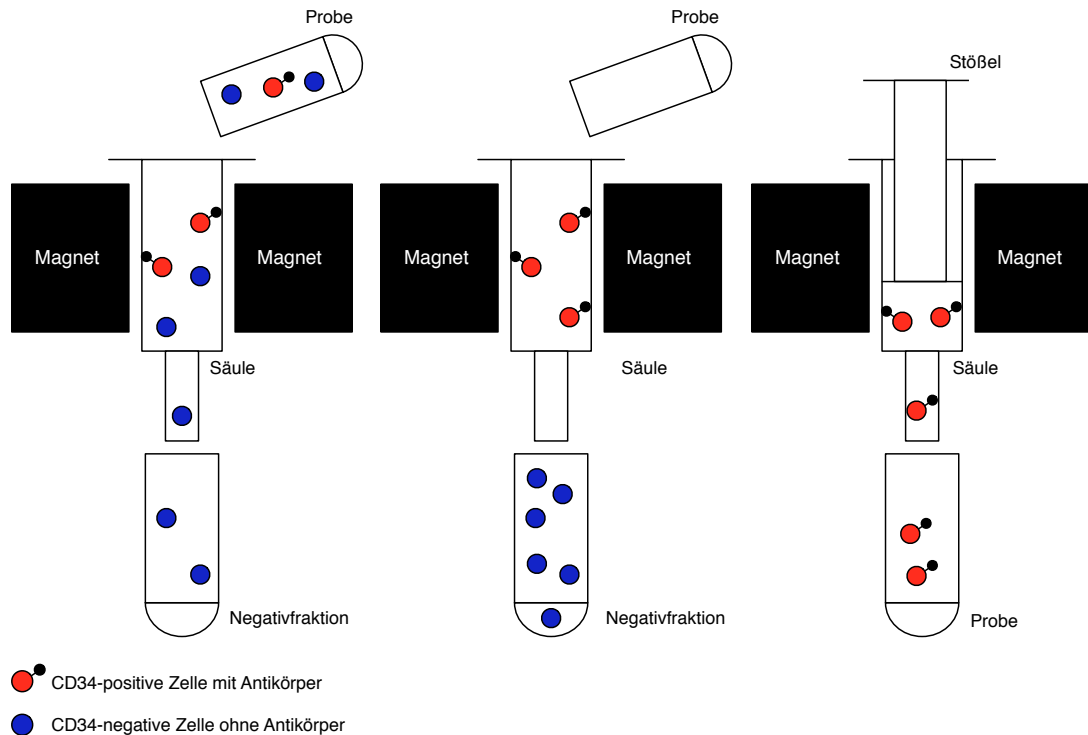


Abbildung 2: Dargestellt ist das Prinzip der Positivselektion der CD34-positiven Zellen: die Proben, die zuvor mit dem CD34-Antikörper mit magnetischen Mikropartikeln inkubiert wurden, werden auf die Säulen gegeben, die sich in einem magnetischen Feld befinden; die CD34-positiven Zellen werden aufgrund der am CD34-Antikörper befindlichen magnetischen Mikropartikel im Magnetfeld zurückgehalten. Im Durchfluss finden sich nur noch CD34-negative Zellen. Zuletzt werden die Zellen mittels Druck über einen Stößel aus der Säule gelöst.

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Prinzip

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen auf verschiedene Eigenschaften untersucht, während sie durch eine dünne Messkammer fließen. Mittels hydrodynamischer Fokussierung passieren die Zellen die Kammer einzeln hintereinander. Während der Durchwanderung werden die Zellen von einem Laser angestrahlt. Je nach Art der Zelle wird der Laserstrahl abgelenkt bzw. gestreut und von unterschiedlichen Detektoren wahrgenommen. Meist wird das Streulicht an zwei Stellen gemessen, zum einen nahezu in der Verlängerung des einfallenden Strahls (Vorwärtsstreulichtdetektor) sowie etwa im 90° Winkel des ursprünglichen Strahls (Seitwärtsstreulicht). Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen sich in ihrem Inneren befinden, desto mehr Streulicht entsteht. Dabei hängt das Vorwärtsstreulicht (auf Englisch: forward scatter) von der Größe

der Zelle ab, je größer die Zelle, um so mehr Streulicht gibt es. Je mehr Strukturen eine Zelle im Inneren hat, um so größer ist das Seitwärtsstreulicht (auf Englisch: side scatter), es lässt sich somit auf die Granulation einer Zelle schließen (vergleiche hierzu auch Abbildung 3). Die Ergebnisse werden graphisch in einem sogenannten Dot-Plot dargestellt, dabei wird auf der Abszisse meist der forward scatter und auf der Ordinate der side scatter aufgetragen.

Um weitere Informationen über die Zellen zu erhalten, werden diese vor der Messung mit Antikörpern inkubiert, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert sind. Der Antikörper selbst ist gegen Oberflächenmarker oder Rezeptoren auf der Zelle gerichtet und bindet dadurch an die Zelle. Der mit dem Antikörper konjugierte Fluoreszenzfarbstoff wird bei der Durchwanderung der Messzelle durch den Laserstrahl zur Emission von Licht einer definierten Wellenlänge angeregt. Dieses Licht wird durch das Gerät registriert und es können so Aussagen über die Oberflächenstruktur gemacht werden. Moderne Geräte können mehrere Farbstoffe gleichzeitig messen. Die Ergebnisse sind dabei um so besser, je weniger sich die Spektren der einzelnen Farbstoffe überlappen. Für die hier beschriebenen Versuche wurden die Farbstoffe Phycoerythrin-Cyanin-7 (PC-7) und Phycoerythrin (PE) verwendet. PE hat sein Emissionsmaximum bei 576 nm und PC-7 zwischen 750 und 800 nm.

Wichtiger Bestandteil der Durchflusszytometrie ist der Ausschluss unerwünschter Zellen, das sogenannte Gating. So kann man im ersten Dot Plot, in dem die Zellen nach Größe und Granulation geordnet dargestellt sind, die Population von Zellen auswählen, in der die zu untersuchenden Zellen vermutet werden. In jedem weiteren Plot können je nach Bedarf nur noch diese Zellen angezeigt werden. Die für diese Studie verwendete Gating-Strategie wird in Kapitel 2.5.3 beschrieben.

Um die spezifische Fluoreszenz aufgrund der Bindung von Antikörpern von der unspezifischen Eigenfluoreszenz der Zellen unterscheiden zu können, muss bei jeder Messung eine sogenannte Isotypenkontrolle mitgeführt werden. Diese besteht aus Probenmaterial, das mit gegen IgG1 gerichtete fluoreszierenden Antikörpern inkubiert wurde. Die Isotypenkontrolle gibt Aufschluss über das Maß der Eigenfluoreszenz und der unspezifischen Bindungen, sie dient also als Leerwert.

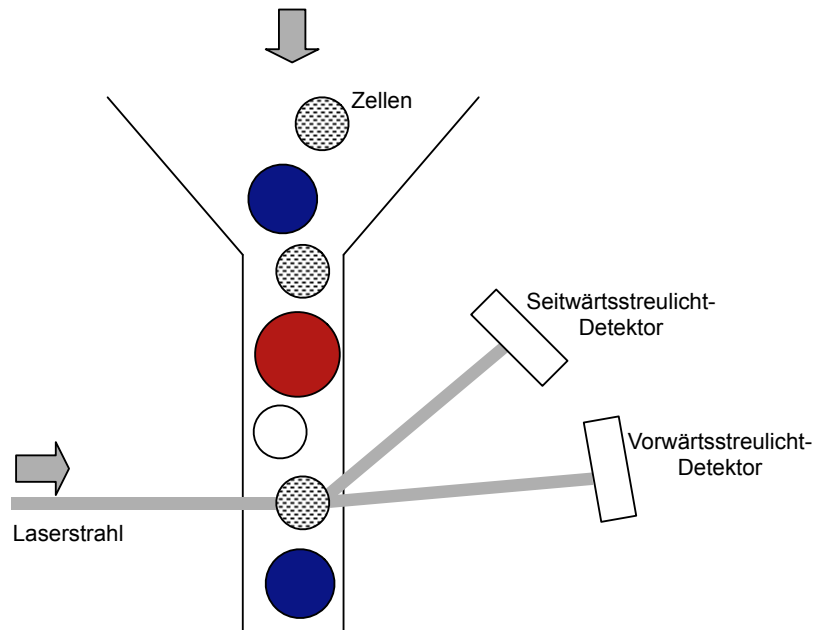


Abbildung 3: Dargestellt ist das Prinzip der Durchflusszytometrie: die zu untersuchenden Zellen werden durch die Flusskammer geleitet. Der Laserstrahl wird je nach Größe und Granulierung der Zelle abgelenkt und vom Vorwärtsstreulicht-Detektor (Größe der Zelle) und Seitwärtsstreulicht-Detektor (Granulierung der Zelle) gemessen

2.5.2 Probenverarbeitung

Die wie in Kapitel 2.4 beschriebenen angereicherten Zellproben wurden mit Fluoreszenzantikörpern inkubiert. Das Pipettierschema kann Tabelle 2 entnommen werden. Nach 20-minütiger Inkubation in Dunkelheit wurden Versa Lyse und IOTest3Fixation (beide Beckman & Coulter, Fullerton, USA) zugegeben. Mit Hilfe der Versa Lyse wurden in der Probe verbleibende Erythrozyten lysiert, die Fixierung ermöglichte eine Lagerung der Proben. Nach 30-minütiger Inkubationszeit wurden die Proben gemessen bzw. bis zur Messung im dunklen Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 2: Pipettierschema der Proben: dargestellt sind Art und Menge der verwendeten Fluoreszenzantikörper für die verschiedenen Probenansätze eines Patienten zu einem Messzeitpunkt.

Probe	PC7		PE	
1	CD34	20 μ l	CD144	25 μ l
2	CD34	20 μ l	VEGF-R2	25 μ l
Isotypenkontrolle	IgG	10 μ l	IgG	12,5 μ l

2.5.3 Messung

Die Messung erfolgte mit dem Cytomics FC 500 von Beckman & Coulter. Zunächst wurde die Isotypenkontrolle gemessen und die Grenzen für positive Fluoreszenz festgestellt (vergleiche hierzu auch Kapitel 2.5.1). Anschließend erfolgte die Messung der beiden Proben. Dabei wurden die Zellen zunächst in einem Plot mit dem forward scatter als Abszisse und dem side scatter als Ordinate dargestellt. In diesem Plot wurde dann ein Gate um die Lymphozytenpopulation gelegt, da sich Progenitorzellen innerhalb dieser Population befinden [8] und auch EPCs in früheren Studien hier identifiziert wurden [88]. In den darauf folgenden Plots wurde lediglich diese Population dargestellt. Als nächstes wurden die CD34-positiven Zellen identifiziert und diese wiederum in einem neuen Plot auf ihre Positivität für CD144 bzw. VEGF-R2 untersucht. Abbildung 4 veranschaulicht diese Gating-Strategie. Alle Proben wurden für 800 Sekunden gemessen.

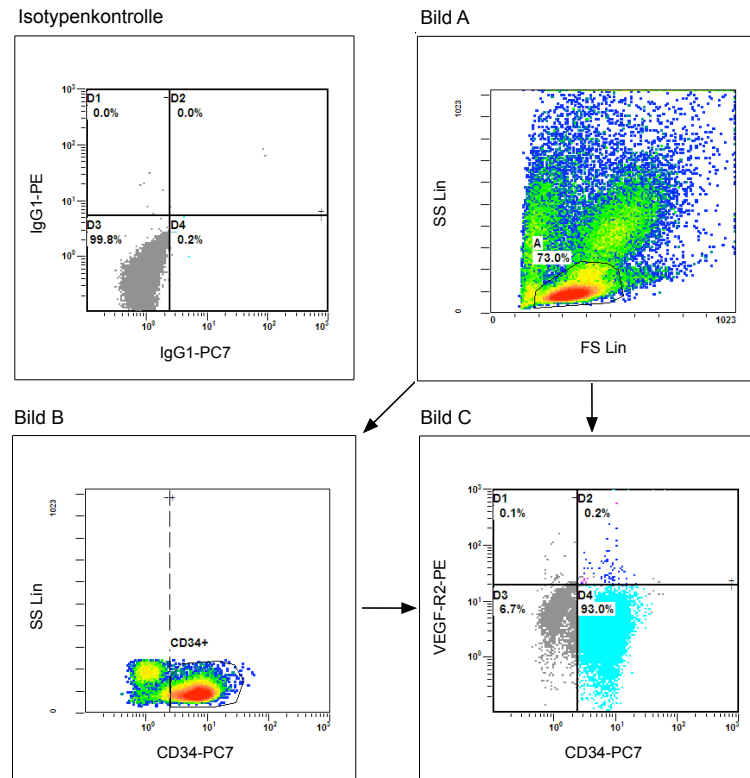


Abbildung 4: Dargestellt ist die Strategie zum Auffinden der CD34-positiven und CD144-positiven bzw. CD34-positiven und VEGF-R2-positiven Zellen. Die Isotypenkontrolle zeigt die Grenzen für Eigenfluoreszenz bzw. unspezifische Bindungen. Bild A zeigt die Probe nach vorheriger Selektion der CD34-positiven Zellen mittels magnetischer Säulen. Zunächst wird ein Gate um die Lymphozyten-Population gelegt; Bild B stellt nur noch die Zellen dar, die in Bild 1 ausgewählt wurden. Hier werden nun die CD34 positiven Zellen ausgewählt und markiert. Bild C zeigt schließlich den Anteil der Zellen an der Gesamtpopulation, die sowohl CD34-positiv als auch VEGF-R2-positiv sind (Quadrat D2).

2.6 VEGF-Plasmabestimmung

Um die Konzentration von VEGF im Blutplasma zu bestimmen, wurden von jeder Patientenprobe unbehandelte Plasmaproben bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren. Die VEGF-Plasma-Konzentration wurde mit Hilfe des Quantikine, Human VEGF Immunoassay (R&D -Systems, Minneapolis, USA) gemessen. Zu Beginn jeder Messung wurde eine Standardreihe für VEGF in abfallender Konzentration von 1000 bis $31,2\text{ pg/ml}$ angesetzt. Die Bestimmung erfolgte nach folgendem Prinzip: Proben bzw. Standard wurden auf eine 96-Well-Platte gegeben, an deren Boden sich ein Antikörper gegen VEGF befand. Während einer zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur konnten die in der Probe vorhandenen VEGF-Moleküle an diesen Antikörper binden. Nach drei Waschschritten mit jeweils $400\text{ }\mu\text{l}$ Waschlösung/Well wurde VEGF-Konjugat zugegeben, das sich während eines weiteren zweistündigen Inkubationsschritts an bereits gebundene VEGF-Moleküle anlagerte. Nach drei weiteren Waschschritten wurde schließlich Substratlösung zugegeben. Die Substratlösung wurde daraufhin in den Wells verarbeitet, in denen VEGF-Konjugat vorhanden war, d.h. initial auch VEGF vorhanden war. Hierdurch kam es zu einer Extinktionszunahme. Dabei korrelierte die Intensität mit der Menge der initial vorhandenen Menge an VEGF. Nach 25 Minuten wurde die Farbreaktion gestoppt und die Platte mithilfe eines Photometers bei 450 nm ausgewertet (Dynex Revelation microplate reader, MTX Lab Systems Inc., Vienna, USA). Mit Hilfe der Standardreihe konnte die Funktion aus Farbumschlag und VEGF-Konzentration bestimmt werden. Zur Kontrolle wurden alle Proben doppelt bestimmt.

2.7 Blutbild

Parallel zu den oben durchgeführten Messungen wurde routinemäßig bei jedem Patienten ein kleines Blutbild bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mit dem ABX Micros 60 der Firma Axon Lab AG (Baden-Dättwil, Schweiz), der folgende Parameter ermittelte: Anzahl der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten, MCV und MCH, Hämoglobin und Hämatokrit sowie ein grobes Differentialblutbild. Alternativ erfolgte die Blutbildbestimmung im Hämatologielabor der Medizinischen Klinik I im Rahmen der normalen Routine-Diagnostik.

2.8 Statistische Auswertung

Dies ist die erste Studie zur Untersuchung des unterschiedlichen Verhaltens der zirkulierenden EPCs und des VEGF-Plasmaspiegels unter metronomischer bzw. klassischer Chemotherapie bei Patienten. Zum Zeitpunkt der Studienplanung lagen noch keine

2 Material & Methoden

Daten zur Höhe des zu erwartenden Unterschiedes vor. Die Studie diente daher als Pilotstudie für die Planung weiterer Studien. Es konnte somit vorab keine Fallzahlplanung erfolgen.

Für die statistische Auswertung wurde die Analyse-Software SPSS Version 14 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Zu jedem Messzeitpunkt wurde der Mittelwert aus den Einzelergebnissen der jeweiligen Gruppen bestimmt. Anschließend wurden die Werte zu den verschiedenen Messzeitpunkten auf statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen untersucht (vor Therapie im Vergleich zu Tag 10 bzw. Tag 21 und Tag 10 im Vergleich zu Tag 21). Berechnungen innerhalb der selben Gruppe wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben ermittelt (Vergleiche zwischen den Messzeitpunkten innerhalb einer Gruppe sowie Vergleiche zwischen den CD34/CD144-positiven und CD34/VEGF-R2-positiven Zellen zum gleichen Messzeitpunkt innerhalb der selben Gruppe). Signifikanzen für Unterschiede zwischen den Gruppen I und II sowie III und IV wurden mit Hilfe des Man-Whitney-U-Testes für unverbundene Stichproben ermittelt. Ergebnisse wurden als signifikant angesehen, wenn $p \leq 0,05$ war.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss klassischer und metronomischer Chemotherapie auf die Anzahl der zirkulierenden EPCs im Blut und auf die VEGF-Plasmakonzentration der jeweiligen Patienten. Zuvor wurden die angewandten Methoden validiert, die Ergebnisse der Validierung sind unter 3.1 dargestellt.

3.1 Methodenvalidierung

Da es sich bei den hier beschriebenen Versuchen um bislang in der Form nicht verwendete Ansätze handelte, wurden zur Methodenvalidierung zusätzliche Untersuchungen durchgeführt. Wegen fehlender Standards wurden insbesondere Messungen zur Wiederholbarkeit der eigenen Ergebnisse sowie zur Vollständigkeit des Messergebnisses unternommen.

3.1.1 Präzision

Um zu überprüfen, ob Messungen unter gleichen Bedingungen und Voraussetzungen zum gleichen Ergebnis führen, wurden gesunden Probanden jeweils fünf Blutröhrchen entnommen und diese wie im Methodenteil in Kapitel 2.4 und 2.5 beschrieben einzeln verarbeitet. Insgesamt wurden bei sechs Probanden jeweils fünf Einzelproben verarbeitet. Aus den Ergebnissen der fünf Einzelmessungen pro Proband wurde der Variationskoeffizient berechnet. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen zeigt Tabelle 6 im Anhang A, die Variationskoeffizienten der Messreihen sind in Tabelle 3 dargestellt. Messungen, die stark von den übrigen Ergebnissen abwichen, wurden nicht für die Berechnung des Variationskoeffizienten verwendet. Die entsprechenden Messungen stehen in Tabelle 6 im Anhang A in Klammern.

Der gleiche Validierungsansatz wurde bei Patienten wiederholt, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Mobilisierungstherapie zur Stammzellapherese erhielten. Vor der Probenverarbeitung wurden die Proben jedes einzelnen Patienten miteinander vermischt und aus der Gesamtprobe die Blutmenge für die weitere Verarbeitung entnommen. Bei diesen Versuchsansätzen unterschieden sich die Ergebnisse der einzelnen Messungen weniger. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen zeigt Tabelle 7 im Anhang A, die Variationskoeffizienten der Messreihen sind in Tabelle 4 dargestellt.

3 Ergebnisse

Tabelle 3: *Variationskoeffizienten aus den Messungen zur Präzisionsbestimmung. Pro gesundem Proband wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt und aus den Ergebnissen der Variationskoeffizient berechnet. Angaben in Prozent.*

Proband	CD34 und CD144 positiv (%)	CD34 und VEGF-R2 positiv (%)
1	36,4	19,2
2	24,7	12,5
3	29,7	45,0
4	42,5	27,9
5	39,2	44,7
6	11,1	19,5

Tabelle 4: *Variationskoeffizienten aus den Messungen zur Präzisionsbestimmung. Pro Patient unter Mobilisierungstherapie wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt und aus den Ergebnissen der Variationskoeffizient berechnet. Angaben in Prozent.*

Patient	CD34 und CD144 positiv (%)	CD34 und VEGF-R2 positiv (%)
1	3,7	5,7
2	9,6	4,2
3	9,1	14,0
4	5,4	7,6
5	12,4	16,8
6	22,2	14,6

3.1.2 Recovery

An sechs Probanden wurden Messungen durchgeführt, um zu überprüfen, wie viele der CD34-positiven Zellen während des Aufreinigungsprozesses verloren gehen. Die Aufarbeitung der Proben ist im Kapitel 2.1.4 unter Material und Methoden beschrieben. Der Anteil der CD34-positiven Zellen, die sich im Durchfluss befanden (d.h. die Negativfraktion), lag bei diesen Messungen konstant unter 5 % der Gesamtzahl, wie in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: *Dargestellt sind die Gesamtzahlen der CD34-positiven Zellen sowohl der aufgereinigten Probe als auch des Durchflusses, sowie der Anteil der Zellen im Durchfluss an der Gesamtzahl.*

Proband	Zellen Probe	Zellen Durchfluss	Anteil
1	4312	96	2,18 %
2	2007	34	1,67 %
3	1968	3	0,15 %
4	3551	29	0,81 %
5	2293	107	4,46 %
6	1664	44	2,58 %

3.2 Anzahl der zirkulierenden EPCs

Bislang gibt es keine einheitliche Definition der EPCs anhand von Oberflächenmarkern. Verschiedene Autoren beschrieben EPCs als CD34-positiv und CD144-positiv, andere wiederum als CD34-positiv und VEGF-R2-positiv (vgl. Kapitel 1.3). Die parallele Untersuchung von VEGF-R2 und CD144 war nicht möglich, da beide Antikörper zum Zeitpunkt der Studienplanung und -durchführung nur mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff markiert vorlagen. In dieser Studie wurden deshalb diese beiden Populationen der zirkulierenden EPCs untersucht und verglichen, ob diese unterschiedlich auf die verschiedenen Therapien reagieren. Population 1 wurde als CD34-positiv und CD144-positiv definiert, Population 2 als CD34-positiv und VEGF-R2-positiv.

3.2.1 CD144-positive und CD34-positive Zellen

Abbildung 5 zeigt, wie sich die Anzahl der CD144-positiven und CD34-positiven Zellen in den vier Patientengruppen verhält (Gruppe I und II klassische Chemotherapie, Gruppe III und IV metronomische Chemotherapie). Auf der Abszisse sind jeweils die drei Messzeitpunkte aufgetragen (vor Chemotherapie, Tag 10 und 21 nach Chemotherapie). Die Ordinate zeigt die Anzahl der zirkulierenden EPCs/ml Blut sowie den Standardfehler des Mittelwertes. Die Klammern zeigen den p-Wert zwischen zwei verschiedenen Messungen.

Bei Gruppe I handelt es sich um Patienten, bei denen die Therapie adjuvant erfolgte, nach vollständiger operativer Entfernung des ursprünglichen Tumorgewebes (R0-Resektion). Unter klassischer Chemotherapie nach dem FEC-Schema sinkt hier die Anzahl der zirkulierenden EPCs an Tag 10 im Vergleich zum Ausgangswert zunächst ab, steigt dann jedoch an Tag 21 auf einen Wert etwas über dem Ausgangswert an. Statistisch signifikant ist der Abfall von Tag 0 zu Tag 10 sowie der Anstieg von Tag 10 zu Tag 21 ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,002$).

Gruppe II erhielt ebenfalls eine klassische Chemotherapie, in diesem Fall nach dem CHOP-Schema in Kombination mit Rituximab. In dieser Gruppe sind ähnliche Veränderungen wie in Gruppe I zu beobachten. Die Anzahl der Zellen fällt unter Therapie zunächst ab (Tag 10 im Vergleich zu Tag 0) und steigt anschließend auf ein Niveau, das etwas über dem Ausgangsniveau liegt. Statistisch signifikant ist der Abfall von Tag 0 zu Tag 10 ($p = 0,02$) sowie der Anstieg von Tag 10 zu Tag 21 ($p = 0,008$). Vergleicht man die Anzahl der zirkulierenden EPCs in Gruppe I und II zum jeweils gleichen Messzeitpunkt, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Die Anzahl der zirkulierenden EPCs zeigt in Gruppe III und IV ein gegensätzliches Verhalten zur Anzahl in Gruppe I und II. Gruppe III erhielt eine tägliche (metronomische) Chemotherapie mit Trofosamid. Unter dieser Therapie kommt es über den Beobachtungszeitraum zu einem kontinuierlichen Abfall der zirkulierenden EPCs. An

3 Ergebnisse

Tag 21 sinkt die Anzahl der zirkulierenden EPCs auf ca. 50 % des Ausgangswertes ($p = 0,01$).

Gruppe IV erhielt ebenfalls eine tägliche, niedrig dosierte Therapie mit Trofosamid in Kombination mit dem Cox-2-Hemmer Celecoxib. In dieser Gruppe zeigt sich an Tag 10 ebenfalls ein Abfall der Anzahl der zirkulierenden EPCs, an Tag 21 steigen diese jedoch wieder an, bleiben aber unter dem Ausgangsniveau. Die Unterschiede erreichen keine statistische Signifikanz. Vergleicht man die Anzahl der zirkulierenden EPCs in Gruppe III und IV zum jeweils gleichen Messzeitpunkt, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zu Therapiebeginn alle vier Gruppen gleich hohe Ausgangswerte an zirkulierenden EPCs hatten. In den Gruppen mit analogem Therapieschema, d.h. Gruppe I und II mit klassischer Therapie und Gruppe III und IV mit metronomischer Therapie lassen sich ähnliche Effekte beobachten. In Gruppe I und II kommt es an Tag 10 zu einem signifikantem Abfall der Anzahl der zirkulierenden EPCs. An Tag 21 kommt es in beiden Gruppen zu einem erneuten Anstieg der EPCs auf ähnlich hohe Werte wie vor Therapiebeginn. In Gruppe III sinkt unter Therapie die Anzahl der zirkulierenden EPCs signifikant ab, in Gruppe IV nimmt die Anzahl der zirkulierenden EPCs ebenfalls ab, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

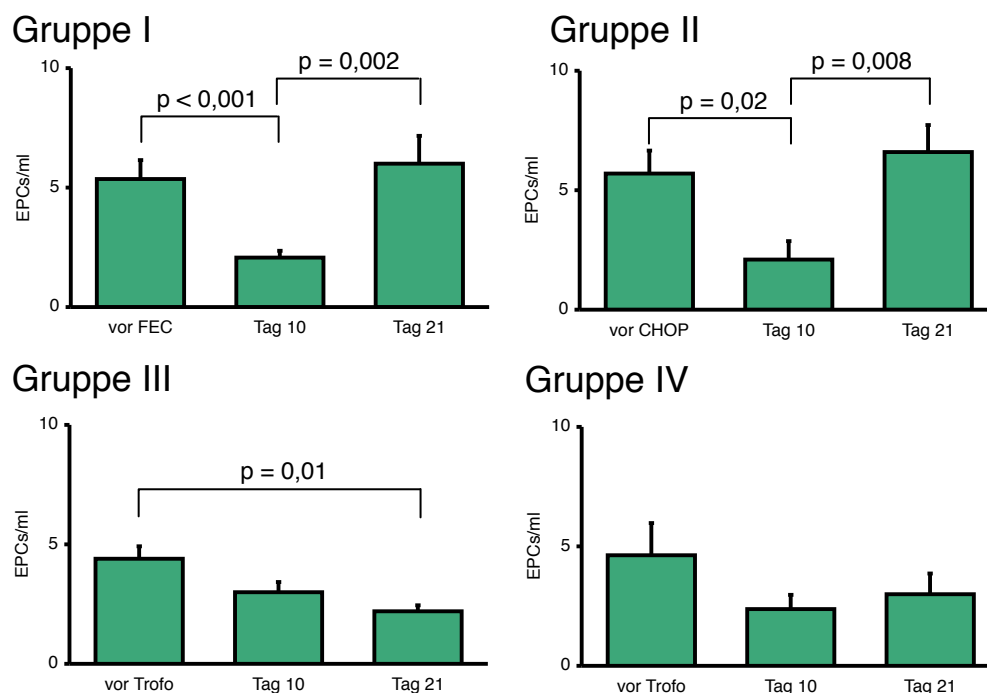


Abbildung 5: Dargestellt sind die Anzahl der zirkulierenden EPCs (definiert als CD34-positiv und CD144-positiv) pro Milliliter Blut sowie der Standardfehler des Mittelwertes; signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind mittels Klammern dargestellt und das Signifikanzniveau angegeben. Gruppe I: adjuvante klassische Chemotherapie bei Mammakarzinom, Gruppe II: klassische Chemotherapie bei NHL, Gruppe III: metronomische Chemotherapie mit Trofosfamid, Gruppe IV: metronomische Chemotherapie mit Trofosfamid und Celecoxib; Trofo = Trofosfamid

3.2.2 VEGF-R2-positive und CD34-positive Zellen

In Abbildung 6 ist der Verlauf der zirkulierenden EPCs – definiert als VEGF-R2-positiv und CD34-positiv – in den vier Patientengruppen dargestellt (Gruppe I und II klassische Chemotherapie, Gruppe III und IV metronomische Chemotherapie). Auf der Abszisse sind jeweils die drei Messzeitpunkte aufgetragen (vor Chemotherapie, Tag 10 und 21 nach Chemotherapie). Die Ordinate zeigt die Anzahl der zirkulierenden EPCs/ml Blut sowie den Standardfehler des Mittelwertes. Die Klammern zeigen den p - Wert zwischen zwei verschiedenen Messungen.

Bei Gruppe I handelt es sich um Patienten, bei denen die Therapie adjuvant erfolgte, nach kompletter Entfernung des ursprünglichen Tumorgewebes (R0-Resektion). Wie in Abbildung 6 dargestellt, sinken in Gruppe I die zirkulierenden EPCs unter klassischer Chemotherapie zunächst ab (Tag 10), steigen jedoch dann zu Ende des 1. Zyklus an Tag 21 auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes an ($p = 0,003$ Tag 0 zu Tag 10 bzw. $p < 0,001$ übrige).

3 Ergebnisse

In Gruppe II, die ebenfalls eine klassische Chemotherapie erhielt, jedoch in diesem Fall mit noch vorhandenem Tumorgewebe, lassen sich ähnliche Phänomene beobachten: zunächst fällt die Anzahl der zirkulierenden EPCs ab (Tag 10), um dann am Ende des 1. Zyklus (Tag 21 bzw. einmalig Tag 14) ebenfalls auf das Doppelte des Ausgangswertes anzusteigen ($p = 0,012$ Tag 0 zu Tag 21 bzw. $p = 0,004$ Tag 10 zu Tag 21). Vergleicht man die Anzahl der zirkulierenden EPCs in Gruppe I und II zum jeweils gleichen Messzeitpunkt, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

In Gruppe III, die eine Monotherapie mit 100 - 150 mg Trofosfamid täglich erhielt, liegen die Ausgangswerte der zirkulierenden EPCs zunächst auf ähnlich hohem Niveau wie in den Gruppen I und II. Unter Therapie fällt die Anzahl der zirkulierenden EPCs bereits an Tag 10 signifikant ab ($p = 0,031$) und bleibt an Tag 21 auf niedrigem Niveau ($p = 0,027$ Tag 0 zu Tag 10 bzw. $p = 0,020$ Tag 0 zu Tag 21).

In Gruppe IV, die eine Kombinationstherapie aus Trofosfamid mit dem Cox-2-Inhibitor Celecoxib erhielt, liegt der Ausgangswert ähnlich hoch wie in den übrigen Gruppen. Unter Therapie kommt es jedoch zu einem signifikanten Abfall der Anzahl der zirkulierenden EPCs an Tag 21 der Therapie auf ca. 50 % des Ausgangswertes ($p = 0,031$). Vergleicht man die Anzahl der zirkulierenden EPCs in Gruppe III und IV zum jeweils gleichen Messzeitpunkt, so lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Zusammenfassend ist zu bemerken, dass alle Gruppen vor Therapiebeginn ähnlich hohe Ausgangswerte an CD34/VEGF-R2-positiven zirkulierenden EPCs hatten. In den Gruppen mit analogem Therapieschema (Gruppe I und II: klassische Therapie, Gruppe III und IV: metronomische Therapie) zeigen die zirkulierenden EPCs ein ähnliches Verhalten. Unter klassischer Therapie kommt es zu einem signifikanten Anstieg ihrer Anzahl, unter metronomischer Therapie hingegen sinkt die Anzahl der zirkulierenden EPCs signifikant ab.

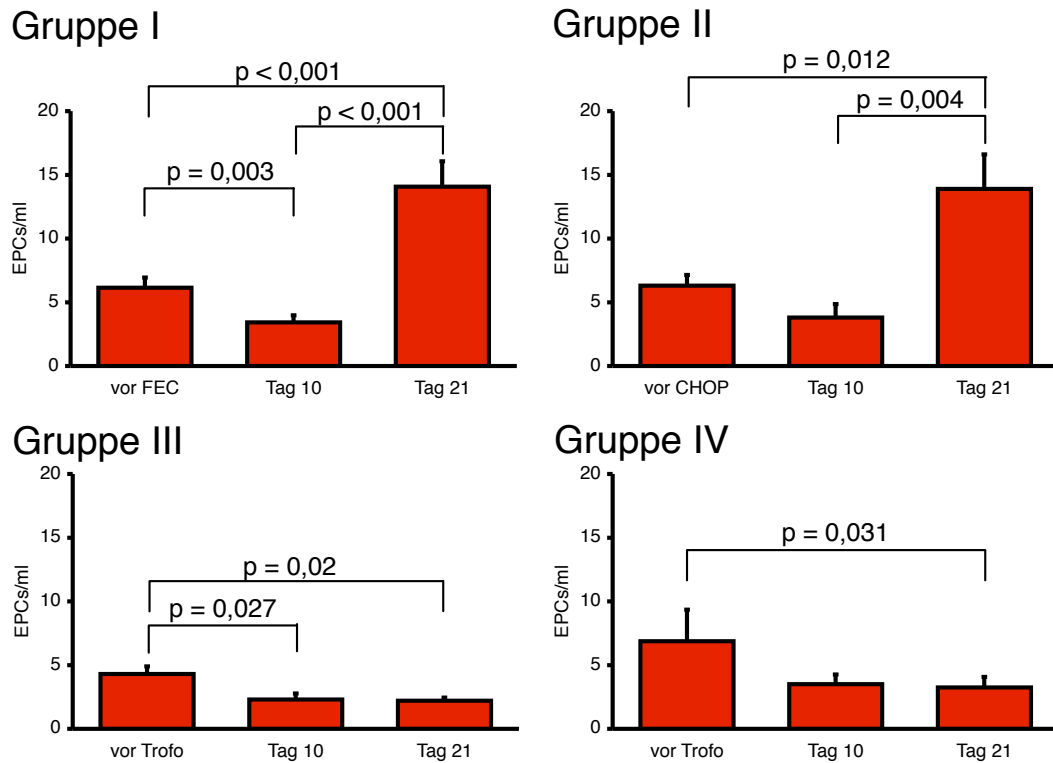


Abbildung 6: Dargestellt sind die Anzahl der zirkulierenden EPCs (definiert als CD34-positiv und VEGF-R2-positiv) pro Milliliter Blut sowie der Standardfehler des Mittelwertes. Signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen sind mittels Klammern dargestellt und das Signifikanzniveau angegeben. Gruppe I: adjuvante klassische Chemotherapie bei Mammakarzinom, Gruppe II: klassische Chemotherapie bei NHL, Gruppe III: metronomische Chemotherapie mit Trofosfamid, Gruppe IV: metronomische Chemotherapie mit Trofosfamid und Celecoxib; Trofo = Trofosfamid

3.3 Vergleich der CD34/CD144-positiven und CD34/VEGF-R2-positiven Zellen

Um weitere Informationen über die Bedeutung von CD144 und VEGF-R2 für die Definition von zirkulierenden EPCs zu erhalten, wurden die Ergebnisse der Messungen für die CD34/CD144-positiven und CD34/VEGF-R2-positiven Zellen innerhalb der einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Abbildung 7 zeigt den Verlauf der zirkulierenden EPCs unter klassischer Chemotherapie mit FEC bzw. CHOP für die Populationen der CD34/CD144-positiven und CD34/VEGF-R2-positiven Zellen. Abbildung 8 zeigt analog den Verlauf der zirkulierenden EPCs unter metronomischer Chemotherapie mit Trofosfamid bzw. Trofosfamid und Celecoxib.

In Gruppe I liegen vor Beginn der klassischen Chemotherapie nach dem FEC-Schema für beide Populationen der zirkulierenden EPCs gleich hohe Ausgangswerte vor, die

3 Ergebnisse

Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. An Tag 10 kommt es in beiden Kurven zu einem erkennbaren Abfall der Anzahl der zirkulierenden EPCs. Die Population der CD34/CD144-positiven Zellen fällt vergleichsweise stärker ab (vgl. gestrichelte rote Linie in Abbildung 7). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0,041$). An Tag 21 ist für beide Populationen ein deutlicher Anstieg im Vergleich zu Tag 10 zu erkennen, der Anstieg ist für die Population der CD34/VEGF-R2-positiven Zellen im Vergleich zu den CD34/CD144-positiven Zellen deutlich erhöht ($p = 0,005$).

Gruppe II hat vor Beginn der klassischen Chemotherapie nach dem CHOP-Schema in beiden EPC-Populationen ähnlich hohe Ausgangswerte wie Gruppe I, es liegen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor. Auch in dieser Gruppe kommt es an Tag 10 zu einem Absinken der zirkulierenden EPCs, wiederum sind die Werte für die Population der CD34/CD144-positiven Zellen signifikant niedriger als die der CD34/VEGF-R2-positiven Zellen ($p = 0,026$). An Tag 21 kommt es in beiden Populationen zu einem deutlichen Anstieg der zirkulierenden EPCs, ebenso wie in Gruppe I ist dieser Anstieg auch für Gruppe II in der Population der CD34/VEGF-R2-positiven Zellen stärker ausgeprägt ($p = 0,005$).

Wie in Abbildung 8 dargestellt, kommt es in Gruppe III unter metronomischer Therapie mit Trofosamid in beiden Zellpopulationen (CD34/CD144-positive und CD34/VEGF-R2-positive Zellen) zu einem Absinken der zirkulierenden EPCs unter Therapie. An Tag 21 bleibt die Anzahl der zirkulierenden EPCs nahezu auf dem gleichen Niveau. In Gruppe III sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Population zu beobachten.

In Gruppe IV kommt es unter metronomischer Therapie mit Trofosamid und Celecoxib ebenfalls zu einem Absinken der zirkulierenden EPCs an Tag 10, der auch an Tag 21 bestehen bleibt. Auch in dieser Gruppe gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Population der CD34/CD144-positiven und CD34/VEGF-R2-positiven Zellen.

3 Ergebnisse

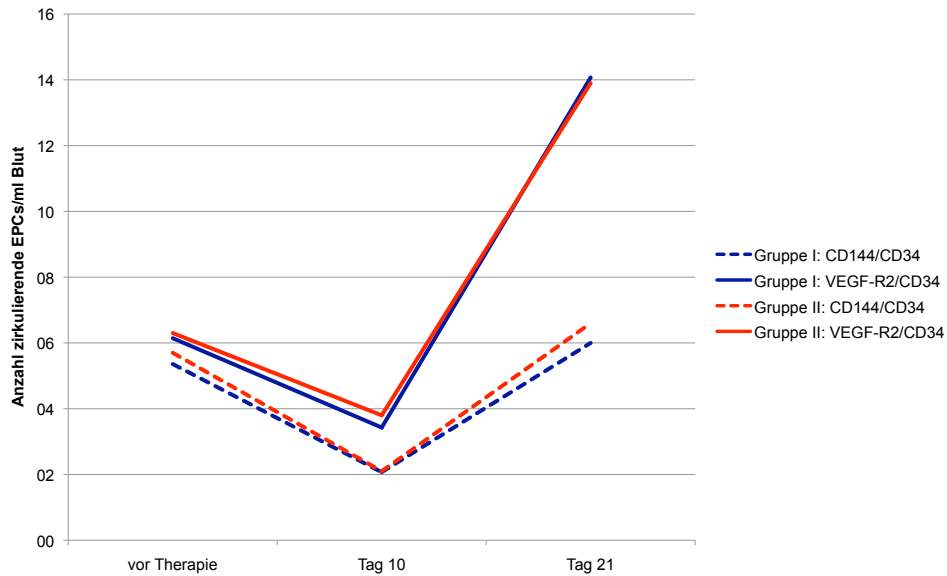


Abbildung 7: Dargestellt ist die Anzahl der zirkulierenden EPCs unter klassischer Chemotherapie für die Populationen der CD34/CD144-positiven und CD34/VEGF-R2-positiven Zellen; die blauen Linien zeigen die Daten von Gruppe I (FEC), die roten die Daten von Gruppe II (CHOP); die gestrichelten Linien zeigen den Verlauf der CD34/CD144-positiven Zellen, die durchgezogenen Linien zeigen den Verlauf der CD34/VEGF-R2-positiven Zellen

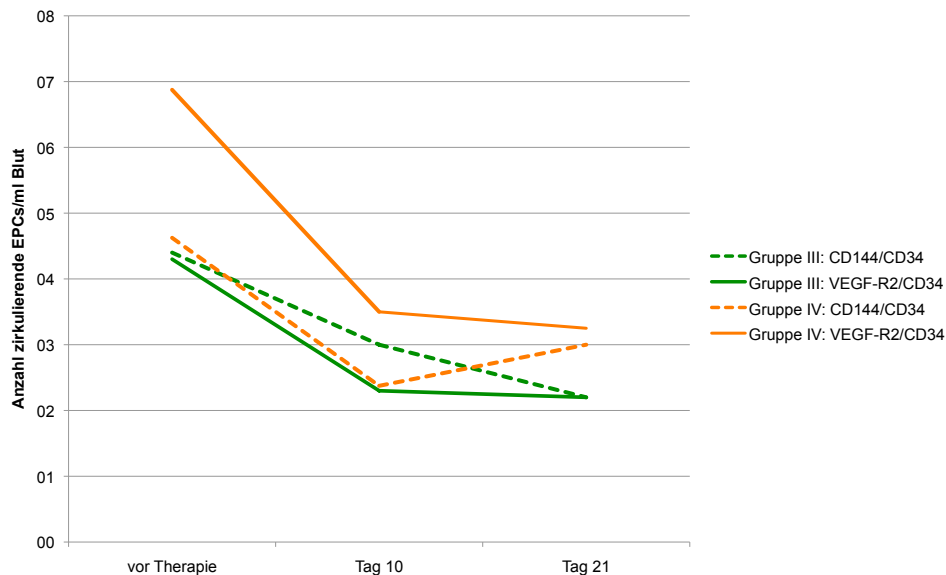


Abbildung 8: Dargestellt ist die Anzahl der zirkulierenden EPCs unter metronomischer Therapie für die Populationen der CD34/CD144-positiven und CD34/VEGF-R2-positiven Zellen; die grünen Linien zeigen die Daten der Gruppe III (Trofosamid), die orangenen Linien zeigen die Daten von Gruppe IV (Trofosamid + Celecoxib); die gestrichelten Linien zeigen den Verlauf der CD34/CD144-positiven Zellen, die durchgezogenen Linien zeigen den Verlauf der CD34/VEGF-R2-positiven Zellen

3.4 CD34-positive Zellen

Seit mehreren Jahrzehnten ist bekannt, dass CD34-positive Zellen im Rahmen einer Chemotherapie aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisiert werden. Aus diesem Grund wurde zu jedem Messzeitpunkt zusätzlich die Anzahl der CD34-positiven Zellen im Blut bestimmt und mit dem Verhalten der zirkulierenden EPCs unter Chemotherapie verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. In Gruppe I sinkt die Anzahl der CD34-positiven Zellen an Tag 10 leicht ab ($p = 0,019$) und steigt dann an Tag 21 auf ca. das 4-fache des Ausgangswertes an ($p = 0,001$ im Vergleich zu Tag 0 und Tag 10). In Gruppe II steigen die CD34-positiven Zellen an Tag 10 leicht an ($p =$ nicht signifikant). An Tag 21 kommt es zu einem weiteren Anstieg, der ebenfalls ca. das 4-fache des Ausgangswertes beträgt ($p = 0,005$ Tag 21 zu Tag 10 bzw. $p = 0,007$ Tag 21 zu Tag 0). In Gruppe III sinken die CD34-positiven Zellen unter Therapie ab (Tag 10) und bleiben auf niedrigerem Niveau (Tag 21), die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. In Gruppe IV bleiben die CD34-positiven Zellen während der gesamten Beobachtungszeit stabil ($p =$ nicht signifikant). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die CD34-positiven Zellen unter den verschiedenen Therapieformen analog zur Anzahl der zirkulierenden EPCs verhält, die CD34- positiv und VEGF-R2-positiv sind.

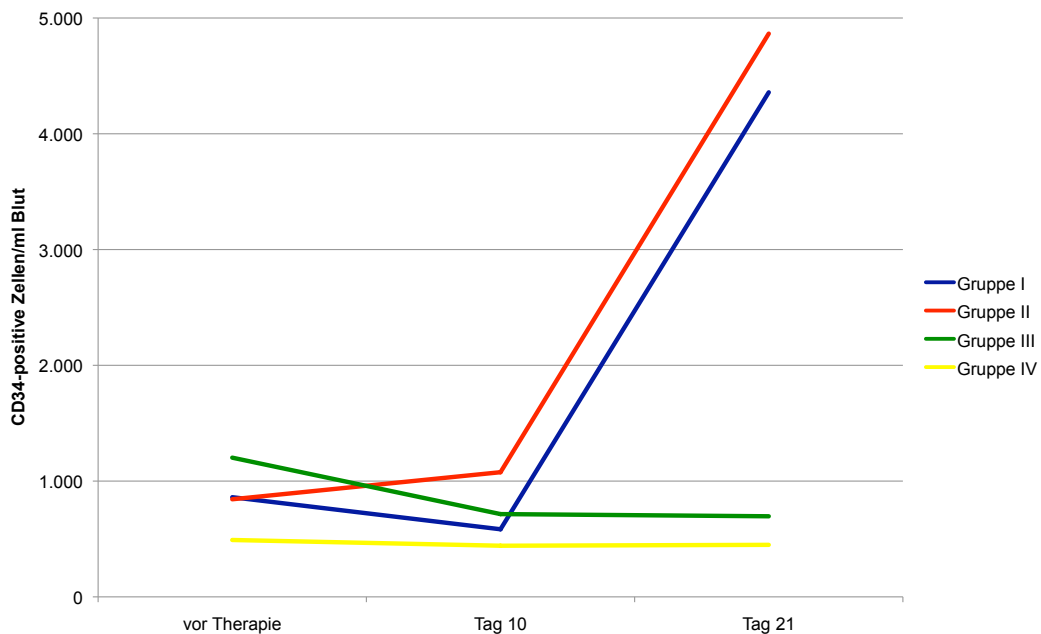


Abbildung 9: Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl CD34-positiver Zellen pro Milliliter Blut zu den verschiedenen Messzeitpunkten in den vier Patientengruppen

3.5 VEGF-Plasmakonzentration

Parallel zur Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen wurde die VEGF-Plasmakonzentration bestimmt. Dazu wurden von jedem Patienten zu jedem Messzeitpunkt Blutplasma Proben tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt verarbeitet.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, bleibt die VEGF-Plasmakonzentration in Gruppe I unter Therapie zunächst stabil (vor Therapie zu Tag 10), steigt dann jedoch an Tag 21 auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes an ($p = 0,001$ vor Therapie zu Tag 21 und Tag 10 zu Tag 21). Der Ausgangswert lag in dieser Gruppe bei durchschnittlich 95,4 pg/nl, an Tag 21 betrug die Konzentration im Mittel 222,2 pg/nl.

In der zweiten Gruppe mit klassischer Chemotherapie (Gruppe II) liegt vor Therapiebeginn ein höherer Ausgangswert der VEGF-Plasmakonzentration vor (Mittelwert: 166,1 pg/nl). Dieser bleibt unter Therapie an Tag 10 stabil (Mittelwert: 171,9 pg/nl). An Tag 21 lässt sich auch in dieser Gruppe eine Zunahme im Vergleich zu Tag 10 erkennen, die jedoch weniger deutlich ausfällt und statistisch nicht signifikant ist (Mittelwert: 246,0 pg/nl). Zwischen den Gruppen I und II lassen sich an den jeweils analogen Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich VEGF-Plasmakonzentration nachweisen.

In Gruppe III konnten keine signifikanten Veränderungen der VEGF-Plasmaspiegel gezeigt werden. Die Werte verhalten sich während der Therapie stabil. Die Werte liegen zu allen Messzeitpunkten zwischen 182,9 pg/nl und 200,7 pg/nl im Durchschnitt.

Unter der Therapie mit Trofosamid und Celecoxib (Gruppe IV) lassen sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen des VEGF-Plasmaspiegels feststellen, die Konzentration bleibt stabil. Dabei liegen die Werte zu allen Messzeitpunkten durchschnittlich zwischen 138,8 pg/nl und 149,3 pg/nl, d.h. höher als die Ausgangswerte in Gruppe I. Zwischen den Gruppen III und IV lassen sich an den jeweils analogen Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich VEGF-Plasmakonzentration nachweisen. Auffällig ist jedoch insgesamt, dass in Gruppe I zu Therapiebeginn die niedrigsten VEGF-Plasmaspiegel vorlagen.

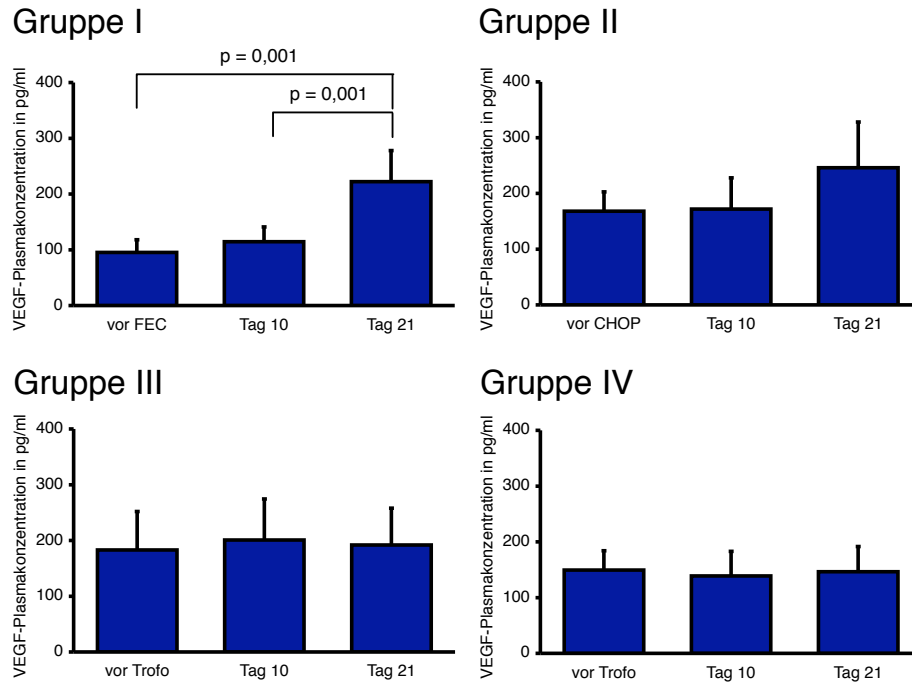


Abbildung 10: Dargestellt ist die VEGF-Plasmakonzentration sowie der Standardfehler des Mittelwertes. Gruppe I: adjuvante klassische Chemotherapie bei Mammakarzinom, Gruppe II: klassische Chemotherapie bei NHL, Gruppe III: metronomische Chemotherapie mit Trofosfamid, Gruppe IV: metronomische Chemotherapie mit Trofosfamid und Celecorib; Trofo = Trofosfamid

3.6 Blutbild

Zu jedem Messzeitpunkt wurde ein Blutbild bestimmt und die Anzahl der Leukozyten und Lymphozyten mit dem Verlauf der zirkulierenden EPCs verglichen.

3.6.1 Leukozyten

Wie in Abbildung 11 dargestellt, sinkt in Gruppe I die Anzahl der Leukozyten an Tag 10 deutlich ab und steigt an Tag 21 auf einen Wert etwas über dem Ausgangswert an. In Gruppe II sinken die Leukozyten an Tag 10 ebenfalls ab. An Tag 21 steigen sie wieder an, bleiben jedoch unter dem Ausgangswert. In Gruppe III sinken die Leukozyten unter Therapie ab (Tag 10) und bleiben auf niedrigerem Niveau (Tag 21). In Gruppe IV bleiben die Leukozyten unter Therapie zunächst stabil (Tag 10). An Tag 21 liegen sie unter dem Ausgangsniveau.

Im Vergleich zur Anzahl der zirkulierenden EPCs ist die Mobilisierung der Leukozyten unter metronomischer Chemotherapie geringer ausgeprägt. Unter metronomischer Therapie ist jedoch analog zum Verlauf der zirkulierenden EPCs ein leichtes Absinken

der Leukozyten zu beobachten.

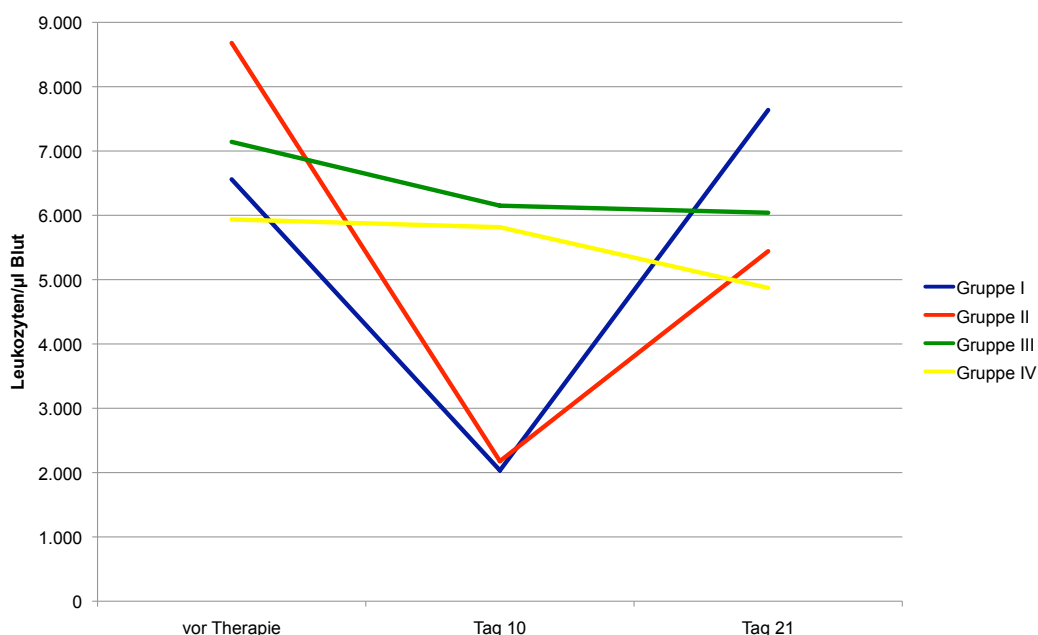


Abbildung 11: Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der Leukozyten pro μl Blut zu den verschiedenen Messzeitpunkten in den vier Patientengruppen

3.6.2 Lymphozyten

Wie in Abbildung 12 dargestellt, sinkt in Gruppe I die Anzahl der Lymphozyten an Tag 10 signifikant ab ($p = 0,04$) und steigt an Tag 21 auf einen Wert etwas über dem Ausgangswert an ($p =$ nicht signifikant für Tag 0 zu Tag 21, $p = 0,04$ für Tag 21 zu Tag 10). In Gruppe II sinken die Lymphozyten an Tag 10 ebenfalls ab ($p = 0,008$). An Tag 21 steigen sie wieder leicht an, bleiben jedoch deutlich unter dem Ausgangswert ($p = 0,008$ für Tag 21 zu Tag 0, p n.s. für Tag 10 zu Tag 21). In Gruppe III sinken die Lymphozyten unter Therapie ab (Tag 10, $p = 0,03$) und bleiben auf niedrigerem Niveau (Tag 21, $p = 0,015$ im Vergleich zu Tag 0). In Gruppe IV sinken die Lymphozyten unter Therapie kontinuierlich ab, $p = 0,017$ für Tag 10 zu Tag 0 bzw. $p = 0,012$ für Tag 21 zu Tag 0. Im Vergleich zur Anzahl der zirkulierenden EPCs ist insbesondere in Gruppe II keine Mobilisierung der Lymphozyten unter klassischer Chemotherapie zu beobachten. Unter metronomischer Chemotherapie kommt es jedoch ebenfalls zu einem Absinken der Lymphozyten.

3 Ergebnisse

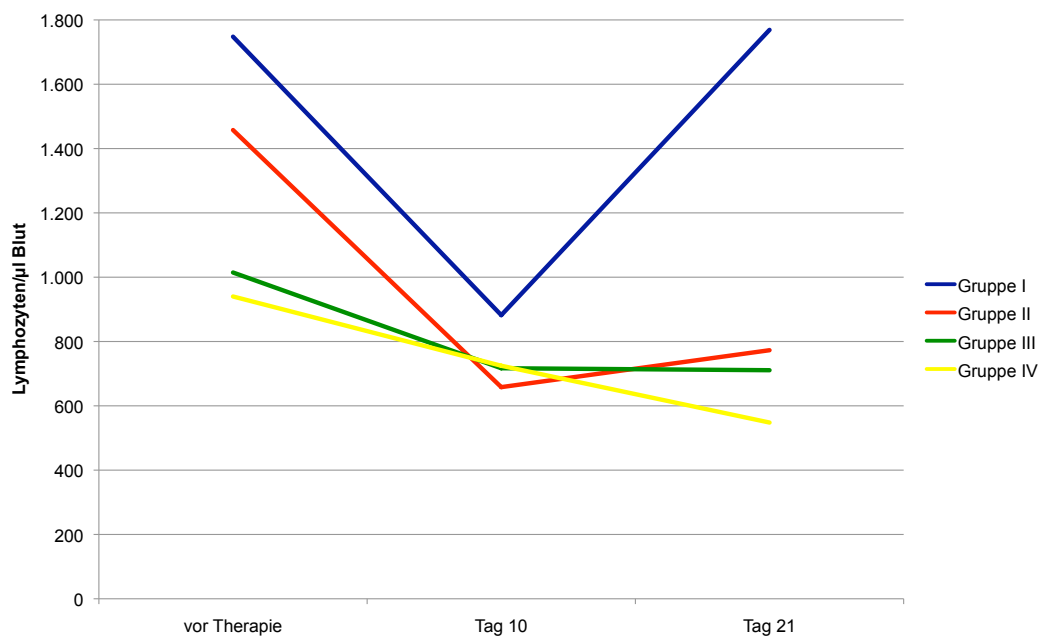


Abbildung 12: Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der Lymphozyten pro μl Blut zu den verschiedenen Messzeitpunkten in den vier Patientengruppen

4 Diskussion

Tierversuche deuten darauf hin, dass die Art der Chemotherapie einen Einfluss auf die Anzahl der zirkulierenden EPCs und verschiedene angiogenetische Stoffe hat [12]. Bislang gibt es jedoch noch keine Daten, die diesen Effekt auch bei Patienten nachweisen konnten. Diese Arbeit untersuchte zum ersten Mal den Einfluss von klassischer und metronomischer Chemotherapie auf die Anzahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (EPCs) und den VEGF-Plasmaspiegel beim Menschen.

Vor Beginn der Studie erfolgte die Validierung der Methoden, da diese in der beschriebenen Form bislang noch nicht verwendet wurden. Die Validierungsschritte orientierten sich an den 'Industriellen Richtlinien für bioanalytische Methodenvalidierung' der amerikanischen Food and Drug Association (FDA).

Zur Bestimmung der Präzision wurden pro gesundem Proband jeweils fünf identische Ansätze hergestellt und aus den Ergebnissen der Variationskoeffizient berechnet. Bei einigen Probanden lag dieser jedoch über dem vorgeschriebenen Höchstwert von 20 % (s. Tabelle 3). Dies könnte zum einen daran gelegen haben, dass bei gesunden Probanden nur eine sehr geringe Anzahl an zirkulierenden EPCs im peripheren Blut zu finden ist [65]. Die erhöhten Variationskoeffizienten könnten eventuell auch durch die Probenverarbeitung zustande gekommen sein. Um die Bedingungen analog zur Studiensituation zu gestalten, wurden insgesamt fünf Blutröhrchen pro Proband abgenommen und diese jeweils einzeln verarbeitet. Es bleibt jedoch unklar, ob in diesen Blutröhrchen von Anfang an die gleichen Konzentrationen an EPCs vorgelegen haben. Aus diesen Gründen wurde eine weitere Versuchsreihe bei Patienten gestartet, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Mobilisierungstherapie zur Stammzellapherese erhielten. Aufgrund der Mobilisierungstherapie waren bei diesen Patienten höhere zirkulierende EPC-Spiegel zu erwarten. Für diese zweite Versuchsreihe wurden die Proben nach der Abnahme und vor der weiteren Verarbeitung zunächst gemischt und anschließend die Validierungsansätze pipettiert. In dieser zweiten Versuchsreihe lag bei 9/10 Messungen der Variationskoeffizienten unter dem vorgeschriebenen Höchstwert von 20 % (s. Tabelle 4). Der Versuchsaufbau kann also als valide angesehen werden.

Als weiterer Schritt im Rahmen der Validierung wurde die Höhe des Verlustes an CD34-positiven Zellen während des Aufreinigungsschrittes gemessen. Dazu wurden bei zehn Ansätzen neben der Anzahl an CD34-positiven Zellen in der aufgereinigten Probe auch die Anzahl der CD34-positiven Zellen in der Negativfraktion bestimmt. Der

Verlustanteil betrug dabei konstant weniger als 5 %, was für eine hohe Ausbeute und gute Reproduzierbarkeit des Versuchsaufbaus spricht (s. Tabelle 5).

Die für diese Arbeit verwendete Methode der Durchflusszytometrie wird in der Regel für den Nachweis von häufigen Ereignissen verwendet. Zirkulierende EPCs kommen jedoch nur in sehr geringer Anzahl im peripheren Blut vor. Die Proben wurden deshalb mit 800 Sekunden über einen sehr langen Zeitintervall analysiert. So konnte sichergestellt werden, dass auch seltene Ereignisse erfasst wurden. Die Messdauer wurde so festgelegt, dass die gesamte Probe im Rahmen der Messung verbraucht wurde. In der Literatur wird als alternatives Verfahren zum Nachweis zirkulierender EPCs deren kulturelle Anzucht beschrieben. Dieses Verfahren eignet sich jedoch auch nur bedingt, da gezeigt werden konnte, dass sich unter Kulturbedingungen die Expressierung von Oberflächenmarkern verändert [9]. Eine Studie von Shantsila et al. konnte darlegen, dass die Anzahl zirkulierender EPCs mittels Durchflusszytometrie besser abgebildet wurde als mittels Zellkultur [77]. Um eine möglichst akkurate Analyse der Anzahl der zirkulierenden EPCs zu gewährleisten, wurde deshalb die Durchflusszytometrie gewählt. Zur Optimierung der Ergebnisse wurden die zu untersuchenden Zellen mittels eines Aufreinigungsverfahrens angereichert und somit ihre Häufigkeit erhöht. Die Ergebnisse der Methodenvalidierung sprechen dafür, dass mit dieser neu etablierten Methode valide Ergebnisse erzeugt werden und diese zu Forschungszwecken für die Analyse seltener Ereignisse benutzt werden kann (s. Kapitel 3.1).

Für die vorliegende Arbeit wurden nach Abschluss der Validierungsphase 42 Patienten untersucht. 24 Patienten erhielten eine klassische Chemotherapie. 18 Patienten erhielten eine metronomische Chemotherapie, acht davon in Kombination mit dem COX-2-Hemmer Celecoxib.

Zunächst wurde das Verhalten der EPCs unter klassischer Chemotherapie untersucht. Dazu wurde der Verlauf der CD34/CD144-positiven sowie CD34/VEGF-R2-positiven Population analysiert. Abbildung 5 zeigt die Anzahl der CD34/CD144-positiven Population zu den Messzeitpunkten, Abbildung 6 zeigt den Verlauf der CD34/VEGF-R2-positiven Population. Beide Populationen sinken unter klassischer Therapie an Tag 10 zunächst ab. An Tag 21 nimmt die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen wieder zu. Innerhalb der CD34/VEGF-R2-positiven Population ist dieser Effekt deutlicher ausgeprägt, als für die CD34/CD144-positive Population. Bei ersterer kommt es zu einem Anstieg auf nahezu das Doppelte des Ausgangswertes zu Therapiebeginn.

Auffällig ist, dass sich die Populationen der CD34/CD144-positiven sowie CD34/VEGF-R2-positiven zirkulierenden EPCs sich zwar ähnlich, aber nicht analog verhalten. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es bislang keine allgemein anerkannte Definition für die Charakterisierung der endothelialen Progenitorzellen anhand von Oberflächenmarkern. Für die vorliegende Arbeit wurden zum einen CD34-positive und VEGF-R2-positive Zellen untersucht, sowie CD34-positive und CD144-positive Zellen, da diese

in verschiedenen Studien als Marker für EPCs verwendet wurden [5, 65, 67]. Wie in Abbildung 7 und 8 dargestellt, zeigen die Populationen der CD34/CD144-positiven Zellen und die der CD34/VEGF-R2-positiven Zellen ein ähnliches Verhalten. Unter klassischer Chemotherapie (Gruppe I und II) steigt die Anzahl der EPCs an Tag 21 in der Population der CD34/VEGF-R2-positiven Zellen auf das doppelte des Ausgangswertes. In der Population der CD34/CD144-positiven Zellen liegen die Werte nur knapp über dem Ausgangswert (p nicht signifikant), eine Mobilisierung der CD34/CD144-positiven Zellen ist an Tag 21 nicht zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass CD144 von den zirkulierenden EPCs erst zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert wird. Eine Mobilisierung von CD144/CD34-positiven Zellen wäre demnach erst nach Tag 21 zu beobachten. Da jedoch an Tag 21 bereits der zweite Zyklus Chemotherapie verabreicht wurde, konnten keine weiteren Untersuchungen in diese Richtung vorgenommen werden. Dieses Ergebnis wird gestützt durch die Daten aus einer Studie, bei der Monozyten aus dem Blut von Probanden in Medium kultiviert und nach 1, 2, 3 und 7 Tagen hinsichtlich der Exprimierung von verschiedenen Markern untersucht wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der CD144-positiven adhären Zellen im zeitlichen Verlauf später zunimmt als die der VEGF-R2-positiven Zellen [9]. Die Funktion von CD144 besteht in der Organisation von Endothelzellkontakten und der Kontrolle von Gefäßpermeabilitäten [53]. Dies spricht ebenfalls dafür, dass CD144 erst zu einem späteren Zeitpunkt der Endothelzellentwicklung eine Rolle spielt. Inzwischen wird von vielen Autoren die Kombination aus CD34-positiven und VEGF-R2-positiven Zellen als Marker für EPCs favorisiert, CD144 wird in aktuellen Studien kaum noch berücksichtigt [30, 90].

Die Beobachtung, dass es unter klassischer Chemotherapie zu einer Mobilisierung von zirkulierenden EPCs kommt, bestätigt die Ergebnisse von Bertolini et al, die zeigen konnten, dass im Tierversuch unter klassischer Chemotherapie die Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen deutlich zunimmt [12]. Neben dem Anstieg der zirkulierenden EPCs kam es außerdem zum vermehrten Wachstum der implantierten Lymphome. Die Mobilisierung von EPCs unter klassischer Chemotherapie wurde ebenfalls in einer klinischen Studie beschrieben. Fürstenberger et al. konnten in einer Untersuchung an zehn Patientinnen, die eine neoadjuvante Chemotherapie aufgrund eines Mammakarzinoms erhielten, zeigen, dass die Anzahl der zirkulierenden EPCs nach zwei Zyklen Chemotherapie signifikant zunahm, auf nahezu das Doppelte des Ausgangswertes [37]. Gruppe II der vorliegenden Studie bestätigt diese Ergebnisse. Eine erst kürzlich publizierte Studie von Roodhart et al. konnte ebenfalls bestätigen, dass es unter klassischer Chemotherapie zu einer Mobilisierung von zirkulierenden EPCs kommt [71].

Die Mobilisierung von EPCs unter Chemotherapie ist von besonderer Bedeutung, da verschiedene Studien nahe legen, dass EPCs an der Vaskularisierung von malignen Tumoren beteiligt sind [4, 28, 58]. Eine vermehrte Tumervaskularisierung könnte wiederum

ein vermehrtes Wachstum des Tumors zur Folge haben. Die Mobilisierung von EPCs durch eine Chemotherapie könnte also den therapeutischen Erfolg schmälern, wenn dadurch indirekt das Wachstum des Tumors gefördert wird. Für die Beteiligung der EPCs an der Tumervaskularisierung sprechen verschiedene präklinische Studien: Asahara et al. untersuchten am Tiermodell den Beitrag von EPCs an der Tumervaskularisierung. Dazu transplantierten sie Mäuse mit Spenderknochenmark, dessen Zellen einen speziellen Farbstoff exprimierten. Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass Spender-EPCs in stark vaskularisierten Regionen des Tumors zu finden sind, insbesondere in der Peripherie des Tumors [4]. Davidoff et al. konnten mit einem ähnlichen Versuchsaufbau zeigen, dass ca. 5 % der Endothelzellen im Gefäßbett eines transfizierten Tumors von Spendermäusen stammten [28]. Andere Gruppen stellten jedoch die Bedeutung der EPCs für die Tumervaskularisierung in Frage. Machein et al. untersuchten an Mäusen, zu welchem Anteil EPCs an der Vaskularisierung von Gliomen beteiligt sind [58]. Zuvor wurde bei den Tieren ebenfalls eine Knochenmarktransplantation durchgeführt. Zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten stammten jedoch nur 0,6 % der Zellen im Gefäßsystem ursprünglich aus dem Knochenmark. Die Gruppe bezweifelte aufgrund des geringen Anteils, dass EPCs einen signifikanten Beitrag zur Tumervaskularisierung leisten. Möglicherweise lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse dadurch erklären, dass die Bedeutung der EPCs für die Tumervaskularisierung von der Tumorentität abhängt.

Fraglich bleibt, ob eine Chemotherapie zu einer Mobilisierung der EPCs führen kann. Bisherige Studien beschrieben eine solche Mobilisierung nur bei Patienten oder Tieren mit vorhandenem Resttumorgewebe [12, 37]. In diesen Studien, ebenso wie in Gruppe II dieser Studie (vergleiche Gruppe II in den Abbildungen 5 und 6), könnte neben der Chemotherapie auch der maligne Tumor eine Mobilisierung bewirkt haben. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden EPCs u.a. durch VEGF aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisiert. VEGF wird zum einen von Endothelzellen als Antwort auf Hypoxie ausgeschüttet [62]. Eine weitere Quelle für VEGF sind jedoch auch die Zellen eines malignen Tumors [75]. Eine vermehrte Mobilisierung von EPCs könnte also auch durch den Tumor selbst verursacht sein. Von besonderem Interesse ist deshalb, dass das Phänomen der Mobilisierung von EPCs unter klassischer Chemotherapie auch in Gruppe I zu sehen ist, einer Gruppe, die eine adjuvante Therapie nach erfolgreicher R0-Resektion erhielt, d.h. zum Zeitpunkt der Therapie tumorfrei war. Die beobachteten Effekte lassen sich bei diesen Patienten nicht durch die malignen Zellen selbst erklären. Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass unter klassischer Chemotherapie bei Patienten ohne nachweisbares Resttumorgewebe eine Mobilisierung von EPCs beobachtet werden kann [83].

Neben der Mobilisierung von EPCs kommt es unter klassischer Therapie ebenfalls zu einer Mobilisierung von CD34-positiven Zellen aus dem Knochenmark (s. Gruppe I und

II in Abbildung 9). An Tag 21 nach Chemotherapie steigt die Anzahl der CD34-positiven Zellen auf das ca. 4-fache des Ausgangswertes an. Das Phänomen der Mobilisierung von CD34-positiven Zellen unter klassischer Chemotherapie wurde erstmals in den 70er Jahren bei Patientinnen beschrieben, die aufgrund eines Ovarialkarzinoms oder anderer solider Tumoren eine klassische Chemotherapie erhielten [70]. Der Effekt wird heutzutage im Rahmen von Mobilisierungstherapien zur Stammzellapherese in der klinischen Routine genutzt. Die Mobilisierung von Subpopulationen der CD34-positiven Zellen, wie z.B. den EPCs, unter konventioneller Chemotherapie war also durchaus zu erwarten. Diese Annahme wird durch die Studie von Capiod et al. unterstützt, die die Verteilung von CD34-positiven Zellen und CD34/CD133/VEGF-R2-positiven Zellen in Stammzellprodukten nach peripherer Stammzellapherese untersuchten und zeigen konnten, dass die Anzahl beider Zellpopulationen stark miteinander korreliert [18]. Dies bestätigt, dass verschiedene Populationen der CD34-positiven Zellen, wie z.B. EPCs, gleichermaßen aus dem Knochenmark mobilisiert werden. Diese Beobachtungen sprechen auch dafür, dass die in dieser Studie beschriebenen Mobilisierungseffekte auf die verabreichte Chemotherapie zurückzuführen sind.

Der Einfluss einer Chemotherapie auf Zellen aus dem Knochenmark lässt sich auch anhand des Blutbildes ablesen. Wie in Abbildung 11 dargestellt, sinkt unter klassischer Therapie die Anzahl der Leukozyten pro Milliliter Blut an Tag 10 zunächst ab. An Tag 21 ist wieder ein Anstieg zu erkennen, der Wert liegt jedoch nur leicht über dem Ausgangswert vor Therapiebeginn. Ähnlich verhalten sich auch die Lymphozyten unter klassischer Chemotherapie, wie in Abbildung 12 dargestellt. Hier kommt es lediglich in Gruppe I an Tag 21 zu einem erneuten Anstieg der Lymphozyten, der ebenfalls nur geringfügig über dem Ausgangswert liegt, die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. In Gruppe II, Patienten mit einem malignen Non-Hodgkin-Lymphom, kommt es an Tag 21 zu keinem erneuten Anstieg der Lymphozyten. Dies lässt sich vermutlich durch die Grunderkrankung und die Therapie mit Rituximab erklären. Das Absinken von Leukozyten und Lymphozyten unter Chemotherapie ist ein seit langem bekanntes Phänomen. Im Vergleich zu den zirkulierenden EPCs und den CD34-positiven Zellen ist der erneute Anstieg dieser Zellen nach Ende des ersten Zyklus vermutlich deshalb nicht so ausgeprägt, da diese Zellen einen längeren Reifungsprozess haben und es erst zu einem späteren Zeitpunkt zum Anstieg kommt.

Im Gegensatz zur beobachteten Mobilisierung unter klassischer Chemotherapie, zeigen die EPCs unter metronomischer Therapie ein gegenläufiges Verhalten. Wie in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt, kommt es unter metronomischer Therapie (Gruppe III und IV) zu einem Absinken der EPCs bzw. bleibt deren Anzahl konstant. Bertolini et al. beschrieben im Tierversuch ähnliche Effekte: bei Mäusen, denen kontinuierlich Cyclophosphamid verabreicht wurde, blieben die EPC-Spiegel konstant und das Tumorwachstum war deutlich reduziert im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne

Therapie oder unter klassischer Chemotherapie [12]. Weitere Tierversuche kamen zu den gleichen Ergebnissen [76]. Bislang gibt es noch keine klinische Studie, die die Anzahl der zirkulierenden EPCs unter alleiniger metronomischer Therapie untersucht. Allerdings gibt es verschiedene klinische Studien, die den Einfluss einer metronomischen Therapie mit zusätzlicher Gabe eines Cox-2-Hemmers auf die Anzahl der zirkulierenden EPCs untersuchen. Buckstein et al. konnten in einer Studie bei 35 Patienten mit NHL zeigen, dass unter metronomischer Chemotherapie mit Cyclophosphamid (50 mg/Tag) und Celecoxib (800 mg/Tag) die Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen sowie ihrer Vorläufer abnimmt [16]. Interessanterweise war die Abnahme der zirkulierenden EPCs nur bei den Patienten statistisch signifikant, die auf die Therapie ansprachen, obwohl sich vor Therapiebeginn keine signifikanten Unterschiede in den Ausgangswerten nachweisen ließen. Twardowski et al. verglichen in einer Phase I Studie eine metronomische Therapie mit entweder Trofosamid (50 mg/Tag) oder Etoposid (50 mg/Tag) jeweils in Kombination mit Celecoxib (800 mg/Tag) [87]. In beiden Gruppen blieb unter Therapie die Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen konstant, eine Reduzierung der EPCs durch die metronomische Therapie in Kombination mit einem Cox-2-Hemmer konnte nicht erzielt werden. Eine metronomische Therapie kann also die unter klassischer Therapie beobachtete Mobilisierung von EPCs verhindern. Klinisch könnte die Kombination einer klassischen Therapie mit einer metronomischen Therapie sinnvoll sein.

Bisher in der Literatur unbeantwortet ist, ob die Mobilisierung von EPCs durch die Kombination einer metronomischen Therapie mit einem Cox-2-Hemmer besser gehemmt werden kann als durch die alleinige metronomische Therapie. Die hier vorliegende Arbeit untersucht zum ersten Mal beide Therapieoptionen in einer Studie (s. Kapitel 2.2). Gruppe III der vorliegenden Arbeit erhielt eine metronomische Therapie mit Trofosamid. Gruppe IV erhielt zusätzlich den Cox-2-Hemmer Celecoxib. Wie in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt, kommt es unter der kombinierten Therapie von Trofosamid und Celecoxib zum Absinken der zirkulierenden EPCs (CD34/VEGF-R2-positive Population) bzw. bleibt ihre Anzahl im Vergleich zum Ausgangswert konstant (CD34/CD144-positive Population). Es lässt sich jedoch im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Trofosamid kein verstärkter Effekt durch die zusätzliche Gabe eines Cox-2-Hemmers nachweisen. Unter alleiniger Therapie mit Trofosamid kommt es sogar zu einem früheren Abfall der CD34/VEGF-R2-positiven EPCs.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wäre durch die Kombination von Trofosamid mit Celecoxib ein verstärkter Effekt zu erwarten gewesen. Cox-2-Hemmer hemmen neben der Proliferation reifer Endothelzellen zusätzlich auch die Bildung verschiedener proangiogenetischer Stoffe. Dadurch könnte der antiangiogenetischen Effekt einer metronomischen Chemotherapie verstärkt werden [80]. Zusätzlich hemmen Cox-2-Hemmer auch EPCs in ihrer Proliferation [25]. Der fehlende Nachweis des zusätzlichen Effektes in dieser Studie könnte verschiedene Gründe haben. Zum einen war der

Beobachtungszeitraum in dieser Studie mit 21 Tagen relativ kurz gewählt. Die bereits zitierten Studien von Buckstein et al. und Twadowski et al. beobachteten ihre Patienten über mehrere Monate [16, 87], d.h. über einen deutlich längeren Zeitraum.

Unter Umständen tritt der zusätzliche Effekt durch den Cox-2-Hemmer erst bei höheren als den hier verwendeten Dosierungen auf. Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass die antiangiogenetische Wirkung von Celecoxib dosisabhängig ist [59]. Patienten, die in dieser Arbeit beobachtet wurden, erhielten 2 x 200 mg Celecoxib täglich bzw. in einem Fall aufgrund kardiovaskulärer Vorerkrankungen nur 2 x 100 mg täglich. In den meisten klinischen Studien wurde Celecoxib jedoch in Dosierungen von 2 x 400 mg täglich verabreicht [3, 16, 87].

Zusätzlich ergeben sich aus dem Studiendesign Probleme für den Vergleich der beiden Gruppen. Da die Studie selbst keinen Einfluss auf die verabreichte Therapie nahm, wurden die Patienten nicht in einen der beiden Therapiearme randomisiert. Insbesondere solche Patienten, bei denen Probleme mit der Gefäßneubildung bereits vorbestanden (wie z.B. das Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit, Zustand nach Apoplex etc.), erhielten keine zusätzliche Therapie mit Celecoxib. In der Studie von Buckstein et al. wurden ebenfalls Patienten mit instabilen kardiovaskulären Erkrankungen und unkontrollierter Hypertension ausgeschlossen [16]. Bei diesen Patienten weisen EPCs jedoch häufig eine verminderte Proliferationsrate auf [64, 88]. Aufgrund der vorbestehenden Proliferationshemmung könnte bei diesen Patienten eine alleinige metronomische Therapie ein ebenso starkes Absinken der zirkulierenden EPCs bewirken wie durch die Kombination mit einem Cox-2-Hemmer bei kardio-vaskulär gesunden Patienten.

Denkbar ist ebenfalls, dass verschiedene Tumorentitäten unterschiedlich auf eine Therapie mit Celecoxib ansprechen. Wie in Tabelle 1 dargestellt, lagen innerhalb der Gruppe IV sehr heterogene Erkrankungen vor. Aus histologischen Untersuchungen ist bekannt, dass Cyclooxygenase-2 von verschiedenen Tumorzelllinien unterschiedlich stark exprimiert wird. Dabei ist die Expressierung bei Ovarial- und Mammakarzinomen deutlich niedriger als beispielsweise bei kolorektalen Karzinomen oder Bronchialkarzinomen [56]. Liegt eine nur geringe Expressierung von Cox-2 vor, so erscheint auch die Hemmung des Enzyms mittels Cox-2-Inhibitor weniger sinnvoll, d.h. eine Therapie wäre weniger erfolgsversprechend.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bislang kontrollierte, randomisierte Studien zum Vergleich von metronomischer Therapie mit und ohne Zugabe eines Cyclooxygenase Hemmers fehlen, um eine genaue Aussage treffen zu können. Bei der Planung einer solchen Studie sollte darauf geachtet werden, dass die zu vergleichenden Gruppe möglichst homogen hinsichtlich der vorliegenden Grund- und Begleiterkrankungen sind. Außerdem sollte auf eine ausreichende Dosierung des Cox-2-Hemmers geachtet werden.

Zur weiteren Charakterisierung des Verhaltens der zirkulierenden EPCs unter klassischer und metronomischer Chemotherapie wurde zusätzlich die VEGF-Plasmakonzen-

tration zu den einzelnen Messzeitpunkten bestimmt. Wie in Abbildung 10 dargestellt, lassen sich unter metronomischer Therapie keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der VEGF-Plasmakonzentration nachweisen, die Spiegel bleiben nahezu konstant. Eine Studie von Colleoni et al. an 48 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, die eine niedrig-dosierte metronomische Chemotherapie mit Methotrexat und Cyclophosphamid erhielten, konnte zeigen, dass nach 2-monatiger Therapie die VEGF-Plasmakonzentration absinkt [24]. Interessanterweise war dieser Abfall nur bei den Patienten signifikant, die auf die Therapie ansprachen. Möglicherweise konnte in der hier vorliegenden Studie kein Absinken der VEGF-Konzentration beobachtet werden, da der Zeitpunkt der letzten Blutuntersuchung mit drei Wochen zu früh gewählt wurde. Alternativ könnte es insgesamt zu keinem Absinken der VEGF-Plasmakonzentration gekommen sein, weil nicht alle Patienten auf die Therapie ansprachen.

Hinsichtlich des VEGF-Plasmaspiegels stellt sich ebenfalls die Frage, ob die zusätzliche Gabe eines Cox-2-Hemmers die Konzentration stärker vermindert. Wie in Abbildung 10 dargestellt, lassen sich hinsichtlich der VEGF-Konzentration keine Unterschiede zwischen der Therapie mit Trofosfamid im Vergleich zu einer kombinierten Therapie mit Trofosfamid und Celecoxib nachweisen. Aufgrund der Studienlage wären verminderte Spiegel durch die zusätzliche Gabe von Celecoxib zu erwarten gewesen. So wurde in verschiedenen Studien berichtet, dass Cox-2-Inhibitoren die Genexprimierung von VEGF in verschiedenen malignen Zelllinien reduzieren können. Dazu gehörten Kolon-, Pankreas- und Magenkarzinome [1, 89, 96]. Infolgedessen wäre auch eine Reduzierung des VEGF-Plasmaspiegels zu erwarten gewesen. Buckstein et al. untersuchten in ihrer bereits zitierten Studie an Patienten mit NHL ebenfalls die VEGF-Plasmakonzentration unter kombinierter Therapie mit Cyclophosphamid und Celecoxib. Hierbei gab es einen Trend zu abfallenden Spiegeln bei Patienten, die auf die Therapie ansprachen. Der Abfall war jedoch statistisch nicht signifikant. Zur abschließenden Beurteilung des Nutzens einer kombinierten metronomischen Therapie mit einem Cox-2-Hemmer fehlen jedoch, wie bereits erwähnt, randomisierte Studien, die beide Therapieoptionen vergleichen.

Im Gegensatz zur metronomischen Chemotherapie verhält sich unter klassischer Chemotherapie die VEGF-Plasmakonzentration analog zur Anzahl der zirkulierenden EPCs. Die VEGF-Plasmakonzentration bleibt zunächst stabil, steigt jedoch an Tag 21 auf erhöhte Werte im Vergleich zum Ausgangswert an. Der Anstieg der VEGF-Plasmakonzentration unter klassischer Chemotherapie ist jedoch nur in Gruppe I statistisch signifikant, d.h. bei Patienten ohne nachweisbares Resttumorgewebe. Auffällig ist auch, dass die Ausgangswerte vor Therapiebeginn in Gruppe I bei 95,5 ng/pl im Mittel lagen, bei Gruppe II mit 168,1 ng/pl deutlich höher. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Möglicherweise sind die erhöhten Spiegel in Gruppe II durch das noch vorhandene Resttumorgewebe bedingt. Nowak et al. konnten in einer

Studie an 36 Patienten mit kleinzelligem und nichtkleinzelligem Bronchialkarzinomen zeigen, dass diese Patienten deutlich höhere Plasmaspiegel an VEGF hatten als gesunde Kontrollpersonen [63]. Das Ansteigen der VEGF-Plasmakonzentration unter klassischer Chemotherapie wurde bereits in einer Studie von Fürstenberger et al. beschrieben, die zehn Patientinnen während einer neoadjuvanter Therapie aufgrund eines Mammakarzinoms untersuchten [37]. Nach 2-monatiger Therapie waren die VEGF-Plasmaspiegel bei diesen Patientinnen signifikant erhöht. Neben VEGF waren auch weitere angiogenetische Faktoren erhöht, wie Erythropoietin, Angiopoietin, Endoglin und Endostatin [37]. In der Studie von Fürstenberger et al. lässt sich jedoch ein Einfluss des Resttumorgewebes nicht ausschließen. Deshalb ist es von besonderem Interesse, dass diese Studie zum ersten Mal erhöhte VEGF-Plasmaspiegel unter klassischer Chemotherapie auch bei Patientinnen ohne nachweisbares Resttumorgewebe zeigen konnte.

Die Abbildungen 5, 6 und 10 zeigen, dass sich die Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen und die VEGF-Plasmakonzentration unter klassischer bzw. metronomischer Chemotherapie ähnlich verhalten. Die gleichsinnig verlaufenden Kinetiken legen die Vermutung nahe, dass erhöhte VEGF-Konzentrationen zur Mobilisierung der EPCs geführt haben. Für diese Hypothese spricht, dass nach systemischer Verabreichung von VEGF die Anzahl der zirkulierenden EPCs zunimmt: Asahara et al. konnten im Tiermodell zeigen, dass nach intraperitonealer Applikation von VEGF die Anzahl der zirkulierenden EPCs im Blut signifikant zunimmt [6]. Hattori et al. konnten im Tierversuch durch die systemische Applikation von VEGF ebenfalls eine Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark in die Blutbahn erreichen [42]. Der Anstieg der VEGF-Plasmakonzentration selbst könnte wiederum als Antwort aus einer direkten Schädigung des Endothels durch die Chemotherapie resultieren. Verschiedene präklinische Studien haben gezeigt, dass Chemotherapeutika, insbesondere Anthrazykline, die Apoptose von Endothelzellen hervorrufen können [61, 91]. Die daraus resultierende Hypoxie ist wiederum ein wichtiger Stimulus für die Freisetzung von VEGF [62]. Die Schädigung der Endothelzellen durch die Chemotherapie könnte also zu einer vermehrten Freisetzung von VEGF führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass klassische Chemotherapie eine Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen bewirkt. Wie bereits erläutert, deuten verschiedene Studien darauf hin, dass EPCs an der Vaskularisierung maligner Tumoren beteiligt sind. Eine verbesserte Vaskularisierung könnte jedoch ein vermehrtes Wachstum des Tumors bedingen. Die Mobilisierung von EPCs durch eine Chemotherapie könnte also den therapeutischen Erfolg schmälern, wenn dadurch indirekt das Wachstum des Tumors gefördert wird. Die Mobilisierung von EPCs unter klassischer Chemotherapie scheint zudem auch einen Einfluss auf die Metastasierung von Tumoren zu haben; beim Wachstum von Metastasen spielt der sogenannte „Angiogenic switch“ eine Rolle. Darunter versteht man den Moment im Wachstum eines malignen Tumors oder seiner

Metastasen, an dem die Ernährung durch Diffusion nicht mehr ausreichend ist. Das maligne Gewebe muss nun selbst proangiogenetische Stoffe bilden und ein eigenes Gefäßsystem aufbauen. Bei Metastasen spielt dieser Schritt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Makrometastasen aus Mikrometastasen. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass nach Hemmung der EPCs Mikrometastasen nicht mehr wachsen und keine Makrometastasen entstehen [38]. Dies deutet darauf hin, dass EPCs an der Regulierung des „Angiogenic switch“ beteiligt sind, ihre Mobilisierung unter Chemotherapie könnte also die Metastasierung fördern.

Aus den Ergebnissen dieser Studie könnten Konsequenzen für die Praxis gezogen werden. Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass EPCs unter klassischer Chemotherapie mobilisiert werden, metronomische Therapie diese Mobilisierung jedoch verhindert. So wäre es für die Praxis denkbar, eine klassische Chemotherapie mit einer anti-angiogenetischen Therapie zu kombinieren. Dadurch könnte eine Mobilisierung der EPCs verhindert und konsekutiv die Vaskularisierung und das Wachstums des Primärtumors und möglicher Metastasen. Für den Nutzen einer solchen Therapie sprechen beispielsweise die Erfolge bei der Therapie von kolorektalen Karzinomen durch die Kombination von einer klassischen Therapie mit einer antiangiogenetischen Therapie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin[®]) [47].

Möglicherweise eignen sich zirkulierende EPCs auch als Biomarker, die das Ansprechen auf eine Therapie bzw. den Aktivitätsgrad einer Tumorerkrankung bestimmen können. In einer Studie an 53 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom konnte gezeigt werden, dass Patienten, die auf die Therapie ansprachen, signifikant niedrigere Konzentrationen an zirkulierenden EPCs nach Ende der Therapie hatten [29]. Außerdem hatten Patienten, die innerhalb von 30 Wochen verstarben, deutlich erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden EPCs als überlebende Patienten. Die Autoren berechneten anhand der Studienergebnisse einen Grenzwert für die Ausgangskonzentration an zirkulierenden EPCs. Patienten mit Ausgangswerten unterhalb des Grenzwertes hatten eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit zur Überleben. Bei Patienten mit multiplem Myelom konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nach 3 - 12-monatiger Therapie mit Thalidomid die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen bei den Patienten abnahm, die auf die Therapie ansprachen [95]. Ähnliche Ergebnisse konnten bei Patienten mit Lymphomen beobachtet werden. Patienten, die auf die Therapie mit einer kompletten Remission reagierten, hatten im Vergleich zum Ausgangswert verminderte oder zumindest stabile EPC-Konzentrationen. Dahingegen hatten Patienten mit einer lediglich partieller Remission oder fehlendem Ansprechen signifikant erhöhte EPC-Konzentrationen [48]. Eine weitere Studie an Patientinnen mit Ovarialkarzinomen konnte ebenfalls zeigen, dass niedrige Spiegel an zirkulierenden EPCs zu Therapiebeginn mit einem längeren Überleben assoziiert sind [84]. Für die meisten Studien wurden jedoch vergleichsweise kleine Fallzahlen untersucht, weitere Studien mit großen Fallzahlen sind daher nötig.

Für die hier beschriebene Studie wurden ebenfalls nur wenige Patienten untersucht, außerdem war der Beobachtungszeitraum mit drei Wochen geringer als in den zitierten Studien, deshalb wurde das Ansprechen auf die Therapie nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Die Aussagekraft der vorliegenden Daten dieser Studie ist dadurch eingeschränkt, dass aufgrund des Pilotcharakters der Studie nur eine geringe Fallzahl pro Gruppe gewählt wurde. Die hier erzielten Ergebnisse können jedoch als Grundlage für die Fallzahlplanung einer größeren Studie dienen. In einer weiteren Studie sollten die Patienten unter metronomischer Therapie auch hinsichtlich der vorliegenden Grunderkrankung in Gruppen mit größerer Fallzahl eingeteilt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zusätzliche Bestimmung der zirkulierenden EPCs und der VEGF-Plasmakonzentration im Rahmen einer Chemotherapie eine vielversprechende Möglichkeit darstellen, um schneller Aussagen über ein Ansprechen auf die Therapie treffen zu können. Zuvor müssen diese Marker jedoch in größeren Studien validiert werden.

5 Zusammenfassung

Die Fähigkeit zur Bildung neuer Blutgefäße spielt für das Wachstum maligner Tumoren eine große Rolle. Neue Blutgefäße können entweder aus bereits bestehenden Gefäßen entstehen oder durch Ausdifferenzierung unreifer Vorläuferzellen, den zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (EPCs). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Art der Chemotherapie die Anzahl der zirkulierenden EPCs beeinflusst und damit möglicherweise auch einen Einfluss auf das Tumorwachstum hat. Während einer klassischen Chemotherapie kommt es zur Mobilisierung von zirkulierenden EPCs, unter metronomischer Therapie sinken diese jedoch ab. Unter metronomischer Therapie versteht man die Verabreichung eines Chemotherapeutikums in regelmäßigen, kurzen Abständen, häufig täglich. Diese Studie sollte untersuchen, ob solche Effekte auch bei Patienten unter Chemotherapie zu beobachten sind.

Insgesamt wurden vier verschiedene Gruppen untersucht:

- Gruppe I erhielt eine klassische Chemotherapie nach dem FEC-Schema aufgrund eines primären Mammakarzinoms, das zuvor vollständig reseziert wurde.
- Gruppe II erhielt eine klassische Chemotherapie nach dem CHOP-Schema in Kombination mit Rituximab aufgrund eines Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL).
- Gruppe III erhielt eine tägliche metronomische Therapie mit Trofosamid.
- Gruppe IV erhielt eine tägliche metronomische Therapie mit Trofosamid und zusätzlich den Cox-2-Hemmer Celecoxib.

Bei allen Patienten erfolgten Blutentnahmen zur Bestimmung der zirkulierenden EPCs und der VEGF-Plasmakonzentrationen. Die Entnahmen erfolgten vor Beginn der Therapie, an Tag 10 nach Therapie sowie an Tag 21, d.h. im Falle der klassischen Chemotherapie vor dem zweiten Zyklus.

Mittels magnetischer Antikörper wurden aus den Proben zunächst die CD34-positiven Zellen isoliert. Anschließend wurden die aufgereinigten Proben mit Fluoreszenzfarbkörpern gegen CD34, CD144 und VEGF-R2 markiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen.

In Gruppe I ist an Tag 21 nach klassischer Chemotherapie eine deutliche Mobilisierung der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen zu beobachten. In Gruppe II kommt

es ebenfalls zu einer Mobilisierung, diese könnte jedoch auch teilweise durch das in dieser Gruppe vorhandene Resttumorgewebe ausgelöst sein. Analog verhält sich die VEGF-Plasmakonzentration in Gruppe I, auch hier kommt es zu einem signifikanten Anstieg an Tag 21. In Gruppe II ist dieser Anstieg statistisch nicht signifikant.

Im Gegensatz dazu kommt es unter metronomischer Therapie zu einem Abfall der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen in Gruppe III und IV. Ein zusätzlicher Effekt durch die kombinierte Therapie mit einem Cox-2-Hemmer ist nicht zu beobachten. Die VEGF-Plasmakonzentration bleibt unter metronomischer Therapie stabil.

Diese Studie zeigt, dass eine klassische Chemotherapie eine Mobilisierung von zirkulierenden EPCs bewirkt. Dieser Effekt ist auch bei Patienten ohne vorhandenes Resttumorgewebe zu beobachten. Unter metronomischer Therapie hingegen sinkt die Anzahl der zirkulierenden EPCs ab. Zirkulierende EPCs sind wahrscheinlich an der Vaskularisierung maligner Tumoren beteiligt, eine Mobilisierung von zirkulierenden EPCs könnte demnach den gewünschten Effekt einer Chemotherapie mindern. Möglicherweise ist dies eine Erklärung dafür, warum die Kombination eines Angiogeneseinhibitors mit einer klassischen Chemotherapie ein verbessertes Ansprechen zeigte. Zusätzlich scheinen zirkulierende EPCs als Biomarker zur Vorhersage eines Therapieerfolges geeignet zu sein. Für die Validierung als solchen fehlen jedoch größere Studien über einen längeren Beobachtungszeitraum, die parallel zur Chemotherapie die Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen bestimmen.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Abdelrahim and S. Safe. Cyclooxygenase-2 inhibitors decrease vascular endothelial growth factor expression in colon cancer cells by enhanced degradation of Sp1 and Sp4 proteins. *Mol Pharmacol*, 68(2):317–329, 2005.
- [2] T. Alon, I. Hemo, A. Itin, J. Pe’er, J. Stone, and E. Keshet. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*, 1(10):1024–1028, 1995.
- [3] N. Altorki, R. Keresztes, J. Port, D. Libby, R. Korst, D. Flieder, C. Ferrara, D. Yankelevitz, K. Subbaramaiah, M. Pasmantier, and A. Dannenberg. Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 21(14):2645–2650, Jul 2003.
- [4] T. Asahara, H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Wagner, and J. M. Isner. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85(3):221–228, 1999.
- [5] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schattman, and J. M. Isner. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302):964–967, 1997.
- [6] T. Asahara, T. Takahashi, H. Masuda, C. Kalka, D. Chen, H. Iwaguro, Y. Inai, M. Silver, and J. M. Isner. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 18(14):3964–3972, 1999.
- [7] D. Ausprunk and J. Folkman. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular research*, 14(1):53–65, 1977.
- [8] R. Barr, J. Whang-Peng, and S. Perry. Hemopoietic stem cells in human peripheral blood. *Science*, 190(4211):284–285, 1975.

- [9] L. Bellik, F. Ledda, and A. Parenti. Morphological and phenotypical characterization of human endothelial progenitor cells in an early stage of differentiation. *FEBS Lett*, 579(12):2731–2736, 2005.
- [10] J. Bender, K. Unverzagt, D. Walker, W. Lee, D. Van Epps, D. Smith, C. Stewart, and L. To. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood*, 77(12):2591–2596, 1991.
- [11] L. Benjamin, D. Golijanin, A. Itin, D. Pode, and E. Keshet. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest*, 103(2):159–165, 1999.
- [12] F. Bertolini, S. Paul, P. Mancuso, S. Monestiroli, A. Gobbi, Y. Shaked, and R. Kerbel. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer Res*, 63(15):4342–4346, 2003.
- [13] C. Blomqvist, T. Wiklund, M. Pajunen, M. Virolainen, and I. Elomaa. Oral trofosfamide: an active drug in the treatment of soft-tissue sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, 36(3):263–265, 1995.
- [14] T. Boehm, J. Folkman, T. Browder, and M. O'Reilly. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390(6658):404–407, 1997.
- [15] T. Browder, C. Butterfield, B. Kraling, B. Shi, B. Marshall, M. O'Reilly, and J. Folkman. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res*, 60(7):1878–1886, 2000.
- [16] R. Buckstein, R. Kerbel, Y. Shaked, R. Nayar, C. Foden, R. Turner, C. Lee, D. Taylor, L. Zhang, S. Man, S. Baruchel, D. Stempak, F. Bertolini, and M. Crump. High-dose celecoxib and metronomic "low-dose" cyclophosphamide is an effective and safe therapy in patients with relapsed and refractory aggressive histology non-hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*, 12(17):5190–5198, 2006.
- [17] J. Caduff, L. Fischer, and P. Burri. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec*, 216(2):154–164, 1986.
- [18] J. C. Capiod, C. Tournois, F. Vitry, M. A. Sevestre, S. Daliphard, T. Reix, P. Nguyen, J. J. Lefrere, and B. Pignon. Characterization and comparison of bone marrow and peripheral blood mononuclear cells used for cellular therapy in critical leg ischaemia: towards a new cellular product. *Vox Sang*, 96(3):256–265, 2009.

- [19] J. Case, L. Mead, W. Bessler, D. Prater, H. White, M. Saadatzadeh, J. Bhavsar, M. Yoder, L. Haneline, and D. Ingram. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*, 35(7):1109–1118, 2007.
- [20] J. Chen, S. De, J. Brainard, and T. Byzova. Metastatic properties of prostate cancer cells are controlled by VEGF. *Cell Commun Adhes*, 11(1):1–11, 2004.
- [21] C. Civin, M. Banquerigo, L. Strauss, and M. Loken. Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol*, 15(1):10–17, 1987.
- [22] C. Civin, L. Strauss, C. Brovall, M. Fackler, J. Schwartz, and J. Shaper. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*, 133(1):157–165, 1984.
- [23] K. Claffey, L. Brown, L. del Aguila, K. Tognazzi, K. Yeo, E. Manseau, and H. Dvorak. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res*, 56(1):172–181, 1996.
- [24] M. Colleoni, A. Rocca, M. Sandri, L. Zorzino, G. Masci, F. Nole, G. Peruzzotti, C. Robertson, L. Orlando, S. Cinieri, F. de Braud, G. Viale, and A. Goldhirsch. Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. *Ann Oncol*, 13(1):73–80, 2002.
- [25] D. Colleselli, K. Bijuklic, B. Mosheimer, and C. Kahler. Inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 affects endothelial progenitor cell proliferation. *Exp Cell Res*, 312(15):2933–2941, 2006.
- [26] D. Connolly, D. Heuvelman, R. Nelson, J. Olander, B. Eppley, J. Delfino, N. Siegel, R. Leimgruber, and J. Feder. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*, 84(5):1470–1478, 1989.
- [27] J. Craig, M. Turner, and A. Parker. Peripheral blood stem cell transplantation. *Blood Rev*, 6(2):59–67, 1992.
- [28] A. Davidoff, C. Ng, P. Brown, M. Leary, W. Spurbeck, J. Zhou, E. Horwitz, E. Vanin, and A. Nienhuis. Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Cancer Res*, 7(9):2870–2879, 2001.

- [29] B. Dome, J. Timar, J. Dobos, L. Meszaros, E. Raso, S. Paku, I. Kenessey, G. Ostoros, M. Magyar, A. Ladanyi, K. Bogos, and J. Tovari. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 66(14):7341–7347, 2006.
- [30] G. Fadini, A. Avogaro, and C. Agostini. Critical assessment of putative endothelial progenitor phenotypes. *Exp Hematol*, 35(10):1479–1480, 2007.
- [31] G. Fadini, M. Miorin, M. Facco, S. Bonamico, I. Baesso, F. Grego, M. Menegolo, S. de Kreutzenberg, A. Tiengo, C. Agostini, and A. Avogaro. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*, 45(9):1449–1457, 2005.
- [32] I. Flamme and W. Risau. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*, 116(2):435–439, 1992.
- [33] J. Folkman, P. Cole, and S. Zimmerman. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg*, 164(3):491–502, 1966.
- [34] J. Folkman and D. Hanahan. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symposia*, 22:339–347, 1991.
- [35] J. Folkman, E. Merler, C. Abernathy, and G. Williams. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, 133(2):275–288, 1971.
- [36] D. Form and R. Auerbach. PGE2 and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*, 172(2):214–218, 1983.
- [37] G. Furstenberger, R. von Moos, R. Lucas, B. Thurlimann, H.-J. Senn, J. Hamacher, and E.-M. Boneberg. Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Br J Cancer*, 94(4):524–531, 2006.
- [38] D. Gao, D. Nolan, A. Mellick, K. Bambino, K. McDonnell, and V. Mittal. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*, 319(5860):195–198, 2008.
- [39] H. Gerber, K. Hillan, A. Ryan, J. Kowalski, G. Keller, L. Rangell, B. Wright, F. Radtke, M. Aguet, and N. Ferrara. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 126(6):1149–1159, 1999.
- [40] H. Gerber, A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B. A. Keyt, V. Dixit, and N. Ferrara. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the

- phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 273(46):30336–30343, 1998.
- [41] M. Gimbrone, R. Aster, R. Cotran, J. Corkery, J. Jandl, and J. Folkman. Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. *Nature*, 222(5188):33–36, 1969.
- [42] K. Hattori, S. Dias, B. Heissig, N. Hackett, D. Lyden, M. Tatenos, D. Hicklin, Z. Zhu, L. Witte, R. Crystal, M. Moore, and S. Rafii. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 193(9):1005–1014, 2001.
- [43] B. Hazar, M. Ergin, E. Seyrek, S. Erdogan, I. Tuncer, and S. Hakverdi. Cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in lymphomas. *Leuk Lymphoma*, 45(7):1395–1399, 2004.
- [44] M. Helsing. Trofosfamide as a salvage treatment with low toxicity in malignant lymphoma. A phase II study. *Eur J Cancer*, 33(3):500–502, 1997.
- [45] S. Hirakawa, S. Kodama, R. Kunstfeld, K. Kajiya, L. Brown, and M. Detmar. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med*, 201(7):1089–1099, 2005.
- [46] M. Hristov, W. Erl, and P. Weber. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med*, 13(5):201–206, 2003.
- [47] H. Hurwitz, L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross, and F. Kabbinavar. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 350(23):2335–2342, Jun 2004.
- [48] C. Igreja, M. Courinha, A. Cachaço, T. Pereira, J. Cabeçadas, M. da Silva, and S. Dias. Characterization and clinical relevance of circulating and biopsy-derived endothelial progenitor cells in lymphoma patients. *Haematologica*, 92(4):469–477, 2007.
- [49] D. Jones, D. Carlton, T. McIntyre, G. Zimmerman, and S. Prescott. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*, 268(12):9049–9054, 1993.
- [50] G. Klement, P. Huang, B. Mayer, S. Green, S. Man, P. Bohlen, D. Hicklin, and R. Kerbel. Differences in therapeutic indexes of combination metronomic

- chemotherapy and an anti-VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res*, 8(1):221–232, 2002.
- [51] T. Klink, C. Bela, S. Stoelting, S. Peters, R. Broll, and T. Wagner. Metronomic trofosfamide inhibits progression of human lung cancer xenografts by exerting anti-angiogenic effects. *J Cancer Res Clin Oncol*, 132(10):643–652, 2006.
 - [52] C. Kollmannsberger, W. Brugger, J. Hartmann, F. Maurer, P. Böhm, L. Kanz, and C. Bokemeyer. Phase II study of oral trofosfamide as palliative therapy in pretreated patients with metastatic soft-tissue sarcoma. *Anticancer Drugs*, 10(5):453–456, 1999.
 - [53] M. Lampugnani, M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L. Ruco, and E. Dejana. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 118(6):1511–1522, 1992.
 - [54] K. Leahy, R. Ornberg, Y. Wang, B. Zweifel, A. Koki, and J. Masferrer. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res*, 62(3):625–631, 2002.
 - [55] B. Li, E. Sharpe, A. Maupin, A. Teleron, A. Pyle, P. Carmeliet, and P. Young. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J*, 20(9):1495–1497, 2006.
 - [56] Z. Liao, K. Mason, and L. Milas. Cyclo-oxygenase-2 and its inhibition in cancer: is there a role? *Drugs*, 67(6):821–845, 2007.
 - [57] Y. Liu, S. Cox, T. Morita, and S. Kourembanas. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, 77(3):638–643, 1995.
 - [58] M. Machein, S. Renninger, E. de Lima-Hahn, and K. Plate. Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas. *Brain Pathol*, 13(4):582–597, 2003.
 - [59] J. Masferrer, K. Leahy, A. Koki, B. Zweifel, S. Settle, B. Woerner, D. Edwards, A. Flickinger, R. Moore, and K. Seibert. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res*, 60(5):1306–1311, 2000.
 - [60] K. Meadows, P. Bryant, and K. Pumiglia. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem*, 276(52):49289–49298, 2001.

- [61] T. Murata, H. Yamawaki, R. Yoshimoto, M. Hori, K. Sato, H. Ozaki, and H. Karaki. Chronic effect of doxorubicin on vascular endothelium assessed by organ culture study. *Life Sci*, 69(22):2685–2695, 2001.
- [62] A. Namiki, E. Brogi, M. Kearney, E. Kim, T. Wu, T. Couffinhal, L. Varticovski, and J. Isner. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem*, 270(52):31189–31195, 1995.
- [63] K. Nowak, N. Rafat, S. Belle, C. Weiss, C. Hanusch, P. Hohenberger, and G. Beck. Circulating endothelial progenitor cells are increased in human lung cancer and correlate with stage of disease. *Eur J Cardiothorac Surg*, 37(4):758–763, 2010.
- [64] A. Oliveras, M. Soler, O. Martínez-Estrada, S. Vázquez, D. Marco-Feliu, J. Vila, S. Vilaró, and J. Lloveras. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. *J Hum Hypertens*, 22(3):183–190, 2008.
- [65] M. Peichev, A. Naiyer, D. Pereira, Z. Zhu, W. Lane, M. Williams, M. Oz, D. Hicklin, L. Witte, M. Moore, and S. Rafii. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95(3):952–958, 2000.
- [66] N. Quirici, D. Soligo, L. Caneva, F. Servida, P. Bossolasco, and G. L. Deliliers. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol*, 115(1):186–194, 2001.
- [67] J. Rehman, J. Li, C. Orschell, and K. March. Peripheral blood endothelial progenitor cells are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 107(8):1164–1169, 2003.
- [68] A. Reichle, T. Vogt, B. Coras, P. Terheyden, K. Neuber, U. Trefzer, E. Schultz, A. Berand, E. Bröcker, M. Landthaler, and R. Andreessen. Targeted combined anti-inflammatory and angiostatic therapy in advanced melanoma: a randomized phase II trial. *Melanoma Res*, 17(6):360–364, 2007.
- [69] M. Reyes, A. Dudek, B. Jahagirdar, L. Koodie, P. Marker, and C. Verfaillie. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*, 109(3):337–346, 2002.
- [70] C. Richman, R. Weiner, and R. Yankee. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood*, 47(6):1031–1039, 1976.
- [71] J. Roodhart, M. Langenberg, J. Vermaat, M. Lolkema, A. Baars, R. Giles, E. Witteveen, and E. Voest. Late release of circulating endothelial cells and endothelial

- progenitor cells after chemotherapy predicts response and survival in cancer patients. *Neoplasia*, 12(1):87–94, 2010.
- [72] P. Salven, A. Orpana, L. Teerenhovi, and H. Joensuu. Simultaneous elevation in the serum concentrations of the angiogenic growth factors VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin lymphoma: a single-institution study of 200 patients. *Blood*, 96(12):3712–3718, 2000.
 - [73] C. Schmidt-Lucke, L. Rossig, S. Fichtlscherer, M. Vasa, M. Britten, U. Kamper, S. Dimmeler, and A. Zeiher. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*, 111(22):2981–2987, 2005.
 - [74] W. Schmidt-Sandte, J. Dageforde, R. Klapdor, T. Wagner, and G. Wiedemann. Trofosfamide in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res*, 19(4A):2485–2487, 1999.
 - [75] D. Senger, C. Perruzzi, J. Feder, and H. Dvorak. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*, 46(11):5629–5632, 1986.
 - [76] Y. Shaked, U. Emmenegger, G. Francia, L. Chen, C. Lee, S. Man, A. Paraghamian, Y. Ben-David, and R. Kerbel. Low-dose metronomic combined with intermittent bolus-dose cyclophosphamide is an effective long-term chemotherapy treatment strategy. *Cancer Res*, 65(16):7045–7051, 2005.
 - [77] E. Shantsila, T. Watson, H. Tse, and G. Lip. Endothelial colony forming units: are they a reliable marker of endothelial progenitor cell numbers? *Ann Med*, 39(6):474–479, 2007.
 - [78] Q. Shi, S. Rafii, M. Wu, E. Wijelath, C. Yu, A. Ishida, Y. Fujita, S. Kothari, R. Mohle, L. Sauvage, M. Moore, R. Storb, and W. Hammond. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92(2):362–367, 1998.
 - [79] S. Singh, I. Clarke, M. Terasaki, V. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, and P. Dirks. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63(18):5821–5828, 2003.
 - [80] K. Spieth, R. Kaufmann, and J. Gille. Metronomic oral low-dose treosulfan chemotherapy combined with cyclooxygenase-2 inhibitor in pretreated advanced melanoma: a pilot study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 52(5):377–382, 2003.

- [81] H. Spring, T. Schuler, B. Arnold, G. Hammerling, and R. Ganss. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(50):18111–18116, 2005.
- [82] S. Stoelting, G. Heinze, R. Nadrowitz, T. Wagner, and S. Peters. Bone marrow-derived endothelial cells contribute to angiogenesis in murine WEHI and JC tumors. *Anticancer Res*, 28(2A):771–777, 2008.
- [83] S. Stoelting, T. Trefzer, J. Kisro, A. Steinke, T. Wagner, and S. Peters. Low-dose oral metronomic chemotherapy prevents mobilization of endothelial progenitor cells into the blood of cancer patients. *In Vivo*, 22(6):831–836, 2008.
- [84] Y. Su, L. Zheng, Q. Wang, W. Li, Z. Cai, S. Xiong, and J. Bao. Quantity and clinical relevance of circulating endothelial progenitor cells in human ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 29:27, 2010.
- [85] T. Takahashi, C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Manner, J. Isner, and T. Asahara. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 5(4):434–438, 1999.
- [86] M. Tsujii, S. Kawano, S. Tsuji, H. Sawaoka, M. Hori, and R. DuBois. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93(5):705–716, 1998.
- [87] P. Twardowski, L. Smith-Powell, M. Carroll, J. VanBalgoooy, C. Ruel, P. Frankel, and T. Synold. Biologic markers of angiogenesis: circulating endothelial cells in patients with advanced malignancies treated on phase I protocol with metronomic chemotherapy and celecoxib. *Cancer Invest*, 26(1):53–59, 2008.
- [88] M. Vasa, S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich, H. Martin, A. Zeiher, and S. Dimmeler. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 89(1):1–7, 2001.
- [89] D. Wei, L. Wang, Y. He, H. Xiong, J. Abbruzzese, and K. Xie. Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity. *Cancer Res*, 64(6):2030–2038, 2004.
- [90] N. Werner, S. Kosiol, T. Schiegl, P. Ahlers, K. Walenta, A. Link, M. Bohm, and G. Nickenig. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 353(10):999–1007, 2005.

- [91] S. Wu, Y. Ko, M. Teng, Y. Ko, L. Hsu, C. Hsueh, Y. Chou, C. Liew, and Y. Lee. Adriamycin-induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: in vitro and in vivo studies. *J Mol Cell Cardiol*, 34(12):1595–1607, 2002.
- [92] A. Yin, S. Miraglia, E. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. Leary, J. Olweus, J. Kearney, and D. Buck. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 90(12):5002–5012, 1997.
- [93] H. Yoshiji, D. Gomez, M. Shibuya, and U. Thorgeirsson. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res*, 56(9):2013–2016, 1996.
- [94] A. Yuan, C. Yu, C. Shun, K. Luh, S. Kuo, Y. Lee, and P. Yang. Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer*, 115(4):545–555, 2005.
- [95] H. Zhang, V. Vakil, M. Braunstein, E. Smith, J. Maroney, L. Chen, K. Dai, J. Berenson, M. Hussain, U. Klueppelberg, A. Norin, H. Akman, T. Ozelik, and O. Batuman. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood*, 105(8):3286–3294, 2005.
- [96] Y. Zhou, J. Ran, C. Tang, J. Wu, L. Honghua, L. Xingwen, C. Ning, and L. Qiao. Effect of celecoxib on E-cadherin, VEGF, Microvessel density and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Biol Ther*, 6(2):269–275, 2007.

Anhang A

Präzision

Tabelle 6: Zur Bestimmung der Präzision des Versuchsaufbaus wurden pro gesundem Proband jeweils 5 Messungen durchgeführt und aus den Messungen anschließend der Variationskoeffizient berechnet; die Tabelle zeigt die Werte aus den Einzelmessungen zur Präzisionsbestimmung. Werte in Klammern wurden nicht für die Berechnung des Variationskoeffizienten verwendet; Angaben in EPCs/ml Blut.

Patient	CD34/CD144					CD34/VEGF-R2				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	4	4	10	6	8	2	2	3	(9)	2
2	2	4	4	4	(9)	7	7	5	7	6
3	3	5	6	7	8	3	8	16	12	9
4	4	2	3	1	2	5	4	8	8	5
5	3	1	2	3	4	2	3	1	1	3
6	4	4	(2)	5	5	4	3	5	(9)	5

Tabelle 7: Zur Bestimmung der Präzision des Versuchsaufbaus wurden pro Patient unter Mobilisierungstherapie jeweils fünf Messungen durchgeführt und aus den Messungen anschließend der Variationskoeffizient berechnet; die Tabelle zeigt die Werte aus den Einzelmessungen zur Präzisionsbestimmung. Werte in Klammern wurden nicht für die Berechnung des Variationskoeffizienten verwendet; Angaben in EPCs/ml Blut.

Patient	CD34/CD144					CD34/VEGF-R2				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	36	40	37	39	38	65	75	74	73	77
2	26	28	27	21	27	74	75	75	74	67
3	36	36	28	34	36	57	83	65	82	77
4	12	14	13	13	(5)	24	22	22	19	23
5	17	12	15	(8)	14	38	55	50	57	65
6	131	84	70	89	111	140	113	103	94	101

Anhang B

Patientendaten

Tabelle 8: Dargestellt sind ausgewählte Patientencharakteristika für Patienten der Gruppe I (adjuvante klassische Chemotherapie bei Mammakarzinom); KOF = Körperoberfläche, F = 5-Fluorouracil, E = Epirubicin, C = Cyclophosphamid

Patient	Alter	♀♂	KOF (m ²)	Mamma CA	Stadium TNM-Klassifikation	Therapie		
						F (mg/m ²)	E (mg/m ²)	C(mg/m ²)
1	59	♀	1,70	invasiv duktal	2,5cm N0 M0 G2	590	100	600
2	74	♀	2,19	invasiv duktal	pT2 pN1a Mx G2	460	70	450
3	42	♀	1,80	invasiv duktal	pT1 bpN0 pM0 G3	500	100	500
4	71	♀	1,69	invasiv duktal	pT4 bpN1 pMx G2	500	100	500
5	59	♀	1,67	invasiv duktal	pT2 pN0 M0 G3	500	100	500
6	61	♀	1,50	invasiv duktal	pT1 cp No Mx G3	600	100	600
7	54	♀	1,73	invasiv duktal	pT1 cpN0 M0 G2	580	90	600
8	44	♀	1,59	invasiv duktal	pT1 cpNo M0 G3	500	100	500
9	62	♀	> 2	invasiv duktal	pT3 pN2a Mx G2	440	90	500
10	33	♀	1,96	invasiv duktal	pT2 pN1a cM0 G2	500	100	500
11	63	♀	1,92	rechts: invasiv duktal links: invasiv lobulär	rechts: pT2 pN0 M0 G2 links: pT1c pN0 M0 G2	500	100	500
12	72	♀	1,67	medullär	pT2 pN0 M0 G3	500	100	500
13	63	♀	1,88	Axillarezidiv links	r pN3a G3	500	100	500
14	68	♀	1,85	invasiv duktal	pT1c pN0 M0 G2	490	100	500

Tabelle 9: Dargestellt sind ausgewählte Patientencharakteristika für Patienten der Gruppe II (klassische Chemotherapie bei NHL); KOF = Körperoberfläche, NHL = Non-Hodgkin-Lymphom, Stadium: Ann-Arbor-Klassifikation, R = Rituximab, C = Cyclophosphamid, A = Adriamycin, V = Vincristin, P = Prednisolon

Patient	Alter	Geschlecht	KOF (m ²)	Art des NHL	Stadium	Therapie				Bemerkungen	
						R (mg/m ²)	C (mg/m ²)	A (mg/m ²)	V (mg)		P (mg)
15	65	♂	1,90	hochm. MALT-L. Rektum	I A	375	750	50	1	5 x 100	Vorphase mit V
16	71	♀	1,60	hochm. B-NHL term. Ileum	II E	375	750	50	2	5 x 100	
17	84	♂	> 2	diffus großzelliges B-NHL	III A	375	750	50	2	5 x 100	
18	64	♂	1,70	hochm. B-NHL Magen	II A	375	750	50	1	5 x 100	CHOP-14
19	70	♀	1,60	Mantelzelllymphom	II A	375	750	50	2	5 x 100	
20	67	♂	> 2	Mantelzelllymphom	IV EB	375	750	50	2	5 x 100	
21	67	♀	1,65	hochm. B-NHL	IV EB	375	750	50	2	5 x 100	
22	53	♀	1,87	niedrigm. B-NHL	IV A	375	800	50	2	5 x 100	
23	76	♂	> 2	hochm. B-NHL	IV AE S	375	750	50	1	5 x 100	Vorphase mit V
24	59	♂	1,70	Mantelzelllymphom	IV A	375	750	50	2	5 x 100	

Tabelle 10: Dargestellt sind ausgewählte Patientencharakteristika für Patienten der Gruppe III (metronomische Therapie mit Trofosamid);
 $KOF = \text{Körperoberfläche}$

Patient	Alter	Geschlecht	KOF (m^2)	Tumorentität	Stadium	Therapie Trofosamid
25	77	♂	1,87	Kolon CA	T3 pN0 pMx G3	2 x 50 mg
26	66	♀	1,71	Adeno-CA Sigma	T3 N2 M1G2 R2	2 x 50 mg
27	48	♀	1,73	neuroend. Bronchial CA	cT2 cN2 cM1	2 x 50 mg
28	73	♀	1,91	invasiv lobuläres Mamma CA	rpT4d cN0 cM1 G2	3 x 50 mg
29	56	♀	1,65	Mamma-CA	pT2 pN2a cM0 R0	2 x 50 mg
30	45	♂	> 2	undiff. Sarkom retroperitoneal	Stadium IV	2 x 50 mg
31	52	♀	1,62	Carcinokom des Uterus	pT3a cN1 pM1 R1	2 x 50 mg
32	65	♂	> 2	Adeno-CA Lunge	pT1 N0 M0 R0 G3	2 x 50 mg
33	77	♀	1,59	Adeno-CA Kolon	pT4 pN2 cMx G2	3 x 50 mg
34	67	♂	1,81	Adeno-CA Pankreas	metastasiert	3 x 50 mg

Tabelle 11: Dargestellt sind ausgewählte Patientencharakteristika für Patienten der Gruppe IV (metronomische Therapie mit Trofosfamid in Kombination mit dem Celecoxib); KOF = Körperoberfläche

Patient	Alter	Geschlecht	KOF (m ²)	Tumorentität	Stadium	Therapie	
						Trofosfamid	Celecoxib
35	74	♀	1,67	Adeno-CA Magen	T4 Nx Mx G3	3 x 50 mg	2 x 100 mg
36	54	♂	1,98	Adeno-CA Kolon	pT3 pN2 M1 G2	3 x 50 mg	2 x 200 mg
37	52	♀	1,99	Adeno-CA Kolon	pT4 pN2 cM0	3 x 50 mg	2 x 200 mg
38	52	♂	1,74	Plattenepithel Larynx	pT2 pN2 cM0 R0, jetzt M1	2 x 50 mg	2 x 200 mg
39	71	♀	1,32	nicht-kleinzelliges Bronchial-CA	metastasiert	2 x 50 mg	2 x 200 mg
40	49	♂	1,91	gering diff. Plattenepithel-CA des Mundbodens (Rezidiv)	metastasiert	2 x 50 mg	2 x 200 mg
41	62	♀	2,00	neuroendokrines Bronchial-CA	metastasiert	2 x 50 mg	2 x 200 mg
42	77	♀	1,90	Rezidiv Gallenblasen CA	pT2 pn1 cMx L1 G2 R0	2 x 50 mg	2 x 200 mg

C Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. T. Wagner, dem ehemaligen Leiter der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik I, sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Labor anfertigen zu können sowie seinem fortwährenden Interesse an der Arbeit. Meiner Betreuerin Frau Dr. S. Stölting gilt mein Dank für die Anleitung bei der Durchführung der Versuche und die konstruktive Kritik beim Verfassen der Arbeit. Frau Dr. A. Lemke aus der Gynäkologischen Hochschulambulanz und der Gemeinschaftspraxis Dres. J. Kisro und D. Uthgenannt möchte ich für die Kooperation bei der Rekrutierung von Studienpatienten danken. Frau Claudia Kauderer und Frau Heike Albrecht danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche. Meiner Kollegin Andrea Steinke möchte ich für die gegenseitige Unterstützung während der praktischen Umsetzung der Arbeit danken. Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mir geduldig bei der Fertigstellung der Arbeit zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Tanja Trefzer
E-Mail	tanja.trefzer@charite.de
Staatsang.	deutsch
Familienstand	ledig

Beruf

seit 09/2007	Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin, Campus Virchow Klinikum, Charité, Universitätsmedizin Berlin
--------------	---

Hochschulstudium

10/00 - 05/07	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
04/05	Preis der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck für besonderes studentisches Engagement

Publikationen

Trefzer T, Steinke A, Peters SO, Stölting S, Wagner T. Different response of endothelial progenitor cells and VEGF-plasma-concentration to metronomic and conventional chemotherapy. *Onkologie* 29 (2006), Suppl.3:1-236

Trefzer T, Stoelting S, Lemke A, Kisro J, Steinke A, Peters SO and Wagner T. Different responses of circulating endothelial progenitor cells and VEGF-plasma concentrations to low-dose metronomic and conventional chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings* 25 (2007), 18S:14053

S. Stölting*, T. Trefzer*, Kisro J, Steinke A, Wagner T, Peters SO. Low-dose oral metronomic chemotherapy prevents mobilization of endothelial progenitor cells into the blood of cancer patients. *In Vivo* 22 (2008), 6:831-836; * contributed equally

Deja M, Trefzer T, Halle E, Spies C. Fortschritte bei der antimikrobiellen Therapie nosokomialer Infektionen. *Intensiv- und Notfallbehandlung* 34 (2009), 1:25-36

Tafelski S, Nachtigall I, Trefzer T, Halle E, Mende H, Briedigkeit L, Martin J, Welte T, Quintel M, Bause H, Geldner G, Schleppers A, Spies C. Evidence-based anti-infective program ABx - Online-program for anti-infective therapy broadens functions for local adaptations. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 44 (2009), 7-8:500-501

Trefzer T, Nachtigall I, Weimann A, de Grahl C, Spies C. Evidence based use of c-reactive protein and procalcitonin in ICU infection. *Intensive Care Medicine, 2009 Abstracts ESICM Vienna* 35 (2009), Suppl.1:0318

Berlin, den 5. August 2010