

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Allgemeine Orthopädie und Tumororthopädie  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Gosheger -

**Entwicklung eines In-vivo-Knochensarkom-Tiermodells am Versuchstier  
Ratte zur Erforschung neuer Therapieansätze in der Knochensarkom-  
Therapie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
vorgelegt von

Haueis, Malte  
aus Oldenburg (Oldb)

2014

Gedruckt mit Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Arne Streitbürger

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Manuel Wenk

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Allgemeine Orthopädie und Tumororthopädie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Gosheger -

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Arne Streitbürger

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Manuel Wenk

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Entwicklung eines In-vivo-Knochensarkom-Tiermodells am Versuchstier Ratte zur Erforschung neuer Therapieansätze in der Knochensarkom-Therapie

Haueis, Malte

Osteosarkome und Chondrosarkome stellen die häufigsten primären Knochensarkome dar. Für das Chondrosarkom gibt es neben der weiten Tumorsektion keine befriedigenden adjuvanten therapeutischen Optionen. Beim Osteosarkom bedarf es speziell für palliative Situationen neue therapeutische Ansätze, um eine hohe Lebensqualität für die Patienten zu ermöglichen.

Die positive Erfahrung mit Bisphosphonaten bei anderen Tumoren weckt das große Interesse und die Hoffnung für neue Therapieansätze auch bei Knochensarkomen um die Prognose der Patienten zu verbessern. Um die komplexen Interaktionen von Tumor und möglicher Therapieansätze weitergehend zu untersuchen ist ein In-vivo-Rattenmodell unabdingbar.

Intention dieser Arbeit war es ein Rattenmodell zu entwickeln, welches einfach zu handhaben ist und reproduzierbar primäre Knochensarkome simuliert. Mit Hilfe dieses Modells sollen sowohl Medikamentenwirkungen als auch Fragen der Tumorsektionen oder Tumorprothesenimplantationen untersucht werden. Um dieses Ziel zu erreichen durchliefen wir verschiedene Entwicklungsschritte. Zuerst erfolgten die Methodenentwicklung und anschließend die Erprobung an der lebendigen Ratte. Aufgrund des fehlenden Wachstums ergänzten wir das Modell in der finalen Modifikation um Cyclosporin A.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Rattenmodell ist es gelungen, reproduzierbar, unter definierten Bedingungen, unsere Ansprüche erfüllend, orthotop in Ratten Osteosarkomzellen anzuzüchten, welche die typischen Eigenschaften von primären Knochensarkomen am Menschen nachahmt. Dies erreichten wir jedoch nur unter Verwendung eines Immunsuppressivums. Für das Chondrosarkom konnten wir kein lokales Tumorwachstum nachweisen. Um dafür zukünftige Erfolge zu erzielen, ist eine weitere Anpassung dieses Modells erforderlich.

Genehmigung Tierversuch: Aktenz.: 8.87-50.10.36.08.100 vom 14.05.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2014

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Entwicklung eines In-vivo-Knochensarkom-Tiermodells am Versuchstier Ratte  
zur Erforschung neuer Therapieansätze in der Knochensarkom-Therapie

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Allgemeine Orthopädie und Tumororthopädie

unter Anleitung von:

Priv.-Doz. Dr. med. Arne Streitbürger

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Münster, 16.12.2014, Malte Haueis

Ort, Datum Unterschrift

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methode</b> .....	<b>5</b>
3.1	Einführung.....	5
3.2	Anforderungen an das In-vivo-Modell .....	5
3.3	Wahl eines geeigneten Versuchstieres .....	6
3.4	Phase 1: Entwicklung des Modells an der toten Ratte .....	8
3.4.1	Mikrochirurgischer Zugangsweg .....	9
3.4.2	Tumorsimulation .....	11
3.4.3	Diaphysäre Lage des Tumors .....	12
3.4.4	Ausmessen der Femur-Innenvolumina .....	13
3.4.5	Tumorsimulation mit Röntgen-Kontrastmittel .....	14
3.4.6	Verfeinerung der Tumorsimulation .....	15
3.4.7	Ausschluß einer Perforation des Femurs .....	16
3.5	Zellkultur .....	17
3.6	Phase 2: Erprobung an der lebendigen Ratten .....	18
3.7	Postoperativer Verlauf .....	21
3.8	Phase 3: Modifikation mit Cyclosporin A .....	22
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>24</b>
4.1	Ergebnisse Phase 1.....	24
4.2	Operation Schritt für Schritt.....	31
4.3	Ergebnisse Phase 2.....	35
4.4	Ergebnisse Phase 3.....	35
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>61</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>62</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>63</b>

# 1 Einleitung

Chondrosarkome stellen mit einer Inzidenz von 3/100.000 Einwohnern/Jahr den am zweithäufigsten auftretenden primären Knochentumor dar. Bevorzugt tritt das Chondrosarkom zwischen dem 40. bis 50. Lebensjahr auf und ist im Beckenbereich und im proximalen Femur lokalisiert (16, 59). Das Osteosarkom ist der häufigste primär maligne, osteogene Knochentumor mit hohem Metastasierungspotenzial. 90% aller Osteosarkome sind konventionelle intramedulläre high-grade Osteosarkome, die vornehmlich in den Metaphysen der langen Röhrenknochen, speziell distale Femurmetaphyse sowie proximale Tibiametaphyse, lokalisiert sind (30). Am häufigsten betroffen sind Jugendliche zwischen dem 13. und dem 16. Lebensjahr (43).

Die derzeitige Therapie des Chondrosarkoms richtet sich vor allem nach dem Grading des Tumors. Tumoren niedrigen Malignitätsgrades (G I) werden lokalisationsabhängig marginal reseziert (z.B. bei Tumoren des Beckens) oder auch intraläsional kürettiert und die entstehenden Defekte mit Knochenzement aufgefüllt (z.B. bei Tumoren der langen Röhrenknochen) (61). Bei Chondrosarkomen höheren Malignitätsgrades (G II – IV) wird bei kurativer Intention immer die weite Tumorsektion angestrebt.

Eine effiziente adjuvante Chemotherapie oder auch ein kurativer Nutzen einer Strahlentherapie konnte bisher in keiner Studie aufgezeigt werden, so dass die weite chirurgische Tumorsektion den heutigen Standard in der Therapie der Chondrosarkome G II - IV darstellt (19, 39). Die adjuvante Chemotherapie bei Patienten mit dedifferenzierten Chondrosarkomen (G IV) nach dem Cooperative OsteoSarcoma Study (COSS) - bzw. EUROpean Bone Over 40 Sarcoma Study (EURO-B.O.S.S.)- Protokoll konnte bisher noch keinen entscheidenden Durchbruch bezüglich des Gesamtüberlebens der therapierten Patienten aufzeigen (15, 26). Die fehlenden adjuvanten Therapieoptionen sowohl der niedrig- als auch der hochmalignen Chondrosarkome führen zu unbefriedigenden Ergebnissen bezüglich der Prognose dieser Patientengruppe verglichen mit anderen primären Knochentumoren (Ewing-Sarkom, Osteosarkom), die einer adjuvanten Therapie zugänglich sind. Trotz adäquater weite Tumorsektion treten, verglichen mit chemosensitiven Tumoren, Lokalrezidive in bis zu 26% der Fälle auf. 49% bis zu 73% der Patienten mit Lokalrezidiven entwickeln Metastasen (19, 39).

Die Entwicklung effektiver adjuvanter Therapieoptionen ist daher unumgänglich, um die Prognose dieser Patienten signifikant zu verbessern.

Für das Osteosarkom ist in den letzten Jahrzehnten eine sehr effektive Chemotherapie entwickelt worden, die in Kombination mit einer weiten operativen Tumorresektion zu einer 5-Jahres-Überlebensrate (ÜLR) von über 70% geführt hat (5). Eine Entwicklung neuer adjuvanter Therapien betrifft vornehmlich Patienten, bei denen die herkömmliche Chemotherapie kein ausreichendes Ansprechen aufweist oder die eine generalisierte Metastasierung aufzeigen und die sich in einer palliativen Therapiesituation befinden.

Die Weiterentwicklung von adjuvanter Therapie-Schemata der Knochensarkome richtet sich vor allem auf die Bereiche der Chemotherapeutika, Immunmodulation und der Strahlentherapie. Aber auch neue medikamentöse Ansätze mit Bisphosphonaten finden vermehrt Anwendung.

Die Bisphosphonate werden schon lange erfolgreich insbesondere bei Erkrankungen des Skelettsystems eingesetzt. Bisphosphonaten kommen jedoch auch in der Tumormedizin ein hoher Stellenwert zu. So werden Bisphosphonate nicht nur in der Therapie benigner Knochenerkrankungen wie der Osteoporose, der Fibrösen Dysplasie oder der Osteogenesis imperfecta eingesetzt, sondern werden mittlerweile auch als Standardtherapeutika in der Behandlung maligner metastatischer Knochenerkrankungen verwendet. Diverse klinische Studien aus den letzten 10 Jahren zeigen bei Patienten, die an diversen soliden Tumoren wie zum Beispiel dem Mamma-Karzinom, dem Prostata-Karzinom, dem Hypernephrom oder auch am multiplen Myelom erkrankt sind, sowohl den positiven klinischen Effekt der Bisphosphonate in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika als auch in Verbindung mit immunmodulativen Medikamenten (3, 31, 48). In diesen Studien konnte ein positiver Effekt der Bisphosphonat-Therapie auf die Tumorerkrankung bzgl. verschiedener Parameter, wie z.B. dem Auftreten und der Anzahl von skeletal related events (SRE), der Anzahl an neuen Knochenmetastasen oder auch der Schmerzsymptomatik der Patienten ausgemacht werden (1, 3, 8, 11, 48). Insgesamt zeigte sich bei einem Großteil der Patienten durch die oben beschriebenen Effekte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit sowie eine Verbesserung der Lebensqualität.

Die Effektivität der Bisphosphonate basiert unter anderem auf deren Wirkung auf den Knochenstoffwechsel. Hierbei bewirken die Bisphosphonate eine Inhibierung der Knochen



abbauenden Osteoklasten und eine Aktivierung der Knochen aufbauenden Osteoblasten (21). Neben dieser Beeinflussung des Knochenstoffwechsels zeigen weitere Studien einen direkten tumortoxischen Effekt der Bisphosphonate auf. Diese Effekte werden durch verschiedenste Wirkmechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene hervorgerufen. Hier zeigten Zellkulturversuche eine potentielle Wirksamkeit der Bisphosphonate gegenüber Osteosarkomzellen sowie die zytotoxische Wirkung auf Chondrosarkomzellen (56, 60).

Bei den primären malignen Knochentumoren gibt es jedoch bisher noch keine klinischen Erfahrungen mit dem Einsatz der Bisphosphonate. Lediglich einzelne in-vitro-Studien mit Zellkulturversuchen haben hier Möglichkeiten für einen potentiellen Einsatz der Bisphosphonate aufgezeigt (55, 56).

Aufgrund der komplexen Wirkmechanismen der Bisphosphonate ist eine Untersuchung nur in einem lebenden Organismus möglich. Nur durch ein In-vivo-Tiermodell kann die Komplexität dieser Vorgänge ausreichend abgebildet, und die Ergebnisse in einem adäquaten Kontext interpretiert und auf den Menschen übertragen werden.

Angesichts positiver klinischer Erfahrungen einer Bisphosphonat-Therapie in Zusammenhang mit anderen Tumorerkrankungen (Mamma-Karzinom, Prostata-Karzinom) erhofft sich unsere Arbeitsgruppe vor allem weiterführende Erkenntnisse für eine neue und effektivere Knochensarkom-Therapie mit den Bisphosphonaten und möchte mit dem in dieser experimentellen Arbeit entwickeltem Tiermodell eine Grundlage zur zukünftigen Erforschung schaffen.

## 2 Ziel der Arbeit

Die Therapie der Knochensarkome bedarf neuer effektiver adjuvanter Optionen, um gerade die Prognosen von Patienten mit Chondrosarkomen signifikant zu verbessern.

Die Weiterentwicklung von adjuvanter Therapie-Schemata der Knochensarkome richtet sich vor allem auf die Bereiche der Chemotherapeutika, Immun- und Strahlentherapie. Aber auch neue medikamentöse Ansätze mit Bisphosphonaten finden vermehrt Anwendung.

Da von unserer Arbeitsgruppe in Zukunft neben der speziellen Fragestellung der Konzentrationsbestimmung der Bisphosphonate auch die Wirkung der Bisphosphonate auf die unterschiedlichen Knochtumoren sowie neue orthopädische operative Vorgehensweisen untersucht werden sollen, benötigen wir ein auf diese verschiedenen Fragestellungen anpassbares, klar strukturiertes und vergleichbares Untersuchungsmodell. Die bisher in der Literatur beschriebenen Tiermodelle eignen sich nicht explizit für unsere Ansprüche an ein solches Modell.

Daher ist das Ziel dieser Arbeit, durch Modifizierung und Erweiterung verschiedener aus der Literatur bekannter Protokolle, ein in der Durchführung einfaches und reproduzierbares Tiermodell zu entwickeln, welches das Tumorwachstum zu vergleichbaren Bedingungen wie im menschlichen Organismus darstellt und unseren Anforderungen gerecht wird. An diesem hiermit erarbeiteten Tiermodell sollen anschließend neue und effektive Therapieoptionen der primären und sekundären Knochensarkome erforscht werden.

Um dieses Ziel zu erreichen haben wir in dieser Arbeit drei experimentelle Phasen der Modellentwicklung durchlaufen. In Phase 1 entwickelten wir das Tiermodell an toten Ratten mit der Eignungsprüfung der Materialien und der Erarbeitung sowie Evaluierung der einzelnen Operationsschritte. Anschließend folgte in der zweiten Phase die Erprobung der Operation an der lebendigen Ratte. Hierfür führten wir die Inokulation der Zelllinien des Chondrosarkoms respektive des hochproliferativen Osteosarkoms durch. Aufgrund unserer bis dahin gewonnenen Erkenntnisse erweiterten wir im letzten Entwicklungsschritt das Modell an der lebendigen Ratte um die perioperative Gabe des Immunsuppressivums Cyclosporin A.

## **3 Material und Methode**

### ***3.1 Einführung***

Im Verlauf dieser experimentellen Modellentwicklung wurden drei Phasen durchlaufen. Zuerst erfolgte die Erprobung der Operation an der toten Ratte. Dabei wurden die einzelnen Schritte der operativen Vorgehensweise unseren Ansprüchen entsprechend entwickelt, evaluiert und das für die Operation notwendige optimale Material getestet.

Anschließend wurde in einer zweiten Phase das Modell unter sterilen Bedingungen an lebenden Ratten angewendet. Hierbei standen die Erkenntnisgewinnung für die Interaktionen mit dem Versuchstier und das perioperative Management im Vordergrund. Es wurden Chondrosarkomzellen sowie Zellen des hochproliferativen Osteosarkoms anhand des im ersten Entwicklungsschritt erarbeiteten Protokolls implantiert. Es folgten sowohl die umfangreiche postoperative Überwachung der klinischen Parameter als auch das regelmäßige Erheben von Röntgenaufnahmen.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse aus Phase 2 erweiterten wir in einer dritten Entwicklungsphase daraufhin das Tiermodell um die perioperative Gabe des Immunsuppressivums Cyclosporin A und durchliefen den Operationsprozess für hochproliferative Osteosarkomzellen erneut.

### ***3.2 Anforderungen an das In-vivo-Modell***

Als Grundlage zur Entwicklung des Tiermodells und als Ansprüche an die zu beachtenden Qualitätskriterien stellten wir diverse Anforderungen an das Modell.

So muss ein reproduzierbares und gleichmäßig stabiles Tumorwachstum im Versuchstier erreicht werden, damit die einzelnen Versuchsreihen miteinander vergleichbar sind. Dieses impliziert die Möglichkeit, durch uns gewonnene Erkenntnisse und Ergebnisse mit bereits in der Literatur publizierter Daten zu vergleichen.

Des Weiteren muss der gewählte iatrogene Zugangsweg zur Tumorapplikation steril, minimalinvasiv, schnell und ohne Kontamination des Zugangsweges durch Tumorzellen

erfolgen. Nur unter diesen Bedingungen kann auf der einen Seite eine für das Versuchstier schonende Vorgehensweise erreicht werden und auf der anderen Seite die intra- und postoperative Komplikationsrate möglichst gering gehalten werden. Diese Vorgehensweise umfasst ebenso die Minimierung der Begleiterscheinungen wie Schmerzen oder Bewegungseinschränkungen für das Versuchstier als auch Berücksichtigung der ethischen Grundsätze der Versuchstierhaltung.

Im Speziellen sollen die physiologischen und anatomischen Verhältnisse sowie die pathologischen Auswirkungen der Knochensarkome in dem Modell abgebildet werden. Dieses bedeutet auf der einen Seite, dass das Tumorwachstum dem im menschlichen Organismus bzgl. Lokalisation, lokalem strukturellen Verhalten und Metastasierungsmuster entsprechen soll, und auf der anderen Seite, dass als Versuchstier bewusst robuste Tiere gewählt werden, dass das biologische Wachstumsmuster des Tumors mit Immunantwort durch das Versuchstier berücksichtigt werden und dass potenzielle Störgrößen minimiert werden. Dadurch wird die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen berücksichtigt.

Da bereits etablierte, vergleichbare, jedoch teilweise auf andere Fragestellungen ausgerichtete Modelle vorliegen, wird durch das Zurückgreifen auf deren Erfahrungen und Ergebnisse bezüglich der Dosierung und Applikation von Bisphosphonaten eine erneute umfangreiche Dosisfindung an unserem Modell hinfällig. Dieses führt zu einer Minimierung der Anzahl der an dem Versuchsvorhaben beteiligten Versuchstiere und zu einer zielgerichteteren Diskussion der Ergebnisse im Kontext der bereits publizierten Daten.

### ***3.3 Wahl eines geeigneten Versuchstieres***

Die vorgesehene Tierart Sprague-Dawley-Ratten eignet sich als Modelltier für diese Fragestellung im Besonderen, da bereits ähnliche Rattenmodelle für Knochentumoren in der Literatur vorliegen (23, 64). Aus dem in der Literatur beschriebenen Modell ergibt sich zum einen das Applikationsverfahren für die vorgesehenen Medikamente, zum anderen aber auch die für die einzelnen Bisphosphonate wirksamen Konzentrationen. Weiterhin lassen sich aus diesem Modell die Grundzüge des Operationsverfahrens ableiten.

Zahlreiche der etablierten Tiermodelle sind für Tumoren entwickelt worden, die entweder einerseits iatrogen lokal im Versuchstier durch lokale Tumorzellapplikation (z.B. im Femur)

ausgelöst werden oder andererseits als primäres Metastasenmodell (Tumorzellinjektion in den linken Herzventrikel) eine hämatogene Metastasierung nachahmen sollen (6, 49). Die Grundlage dieser Modelle ist die Eigenschaft der zur überprüfenden Tumoren (Karzinome), die in der Regel einem hämatogenen Metastasierungsmuster folgen. Eine weitere Eigenschaft der meisten Karzinome ist die Fähigkeit, Knochenmetastasen auszubilden. Diese Metastasen führen in der Regel zu einer osteolytischen Knochendestruktion. Sowohl die vorwiegend osteolytischen (z.B. Mamma-Karzinom) Tumoren als auch die osteoblastischen Tumoren (z.B. Prostata-Karzinom) zeigen eine Knochendestruktion in unterschiedlicher Ausprägung. Diese Eigenschaft trifft wiederum auch auf das Chondrosarkom, das Osteosarkom sowie die anderen primären und sekundären Knochentumoren zu, welche mit einer teils osteolytischen permeativen, teils osteoblastischen Knochendestruktion einhergehen. Somit sind die in der Literatur vorliegenden Karzinom-Tiermodelle und deren Resultate als Referenzstudien zur Auswertung der Ergebnisse aus diesem Versuch gut heranzuziehen, um die Ergebnisse in einem vergleichbaren Kontext zu interpretieren.

Ein weiterer Vorzug in der Verwendung der Ratte als Versuchstier liegt in der Tatsache begründet, dass dieses Modell auch im Hinblick auf weitere Fragestellungen in der Tumororthopädie herangezogen werden kann. Das Versuchstier Maus wäre hierfür insbesondere aufgrund der Größe der Knochen nicht geeignet. Studien zeigen, dass typische tumorchirurgische Operationsschritte an der Maus nicht zu realisieren sind (63). Der Vorzug an unserem Modell liegt außerdem darin begründet, dass in den folgenden durch unsere Arbeitsgruppe geplanten Versuchsvorhaben auf den Erfahrungen mit diesem Tiermodell aufgebaut und somit eine erneute Phase der Methodenentwicklung unsererseits vermieden werden kann.

Die Unterbringung und Versorgung der Tiere erfolgte in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums Münster. Die artgerechte Tierhaltung wurde verhaltensgerecht in Zweierkäfigen unter strenger Einhaltung der tierethischen Erfordernisse durchgeführt.

Die Tiere wurden mit Futter und Tränkung ad libitum versorgt.

Es lag ein Umgebungsklima von 22 bis 24 Grad Celsius und eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 % (mit einer Toleranzbreite von +/- 10%) vor.

Bei der Operation waren die männlichen Sprague-Dawley Ratten ca. 4 Wochen alt und wogen ungefähr 100 Gramm. Beginnend mit diesem Gewicht war das perioperative Handling sowie ein operatives Vorgehen mit den zur Verfügung stehenden Materialien aufgrund der erreichten Wachstumsgröße der hinteren Extremitäten problemlos möglich.

Die Ratten wurden präoperativ über einen Zeitraum von 3 bis 5 Tagen beobachtet. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass sich die Ratten vom Transport erholten und an die neue Umgebung gewöhnten. Auf diese Weise konnte auch der Gesundheitszustand der Tiere festgelegt werden. Diese Überprüfung erfolgte durch Kontrolle des Gewichts und der Gewichtszunahme, durch Beobachten des Sozialverhaltens sowie durch eine körperliche Untersuchung. Bei dieser Untersuchung ist vor allem auf die Bewegungsfähigkeit, auf eventuell vorhandene Wunden oder Abszesse, Tumoren oder Entzündungen wie Konjunktivitis geachtet worden.

### ***3.4 Phase 1: Entwicklung des Modells an der toten Ratte***

Die erste Phase der Methodenentwicklung des Rattenmodells erfolgte im Rahmen von Ausbildungsmaßnahmen der Zentralen Tierversuchseinrichtung der Medizinischen Fakultät an Kadavern von zu Ausbildungszwecken zur Verfügung gestellten Tieren.

Diese Vorgehensweise ist vorteilhaft, da der zeitliche Druck, der mit der Narkoseführung einhergeht, sowie mögliche Komplikationen im Rahmen der Narkose, entfielen.

Außerdem erlaubte es uns die anatomischen Begebenheiten in-situ ausgiebig zu studieren und während jedes neuen Operationsschritts die möglichen Problembereiche gezielt anzuschauen (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Blick von lateral auf das Femur zwischen Flexoren- und Extensorenloge**

Auf diese Weise legten wir die Grundlagen für die Versuche an der lebendigen Ratte.

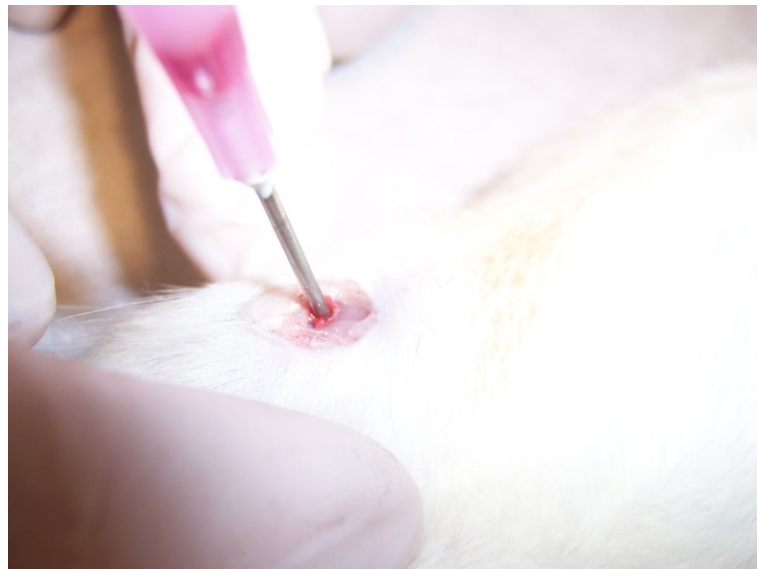
Im Folgenden werden die einzelnen Entwicklungsschritte der Phase 1 vorgestellt:

### **3.4.1 Mikrochirurgischer Zugangsweg**

Die Ratten wurden in einer seitlichen 135°-180° Rückenlage auf dem Operationstisch platziert. Dieses ermöglichte das vorsichtige Fixieren und Ausrichten des Femurs mit der einen Hand, während die andere die Instrumente führen konnte.

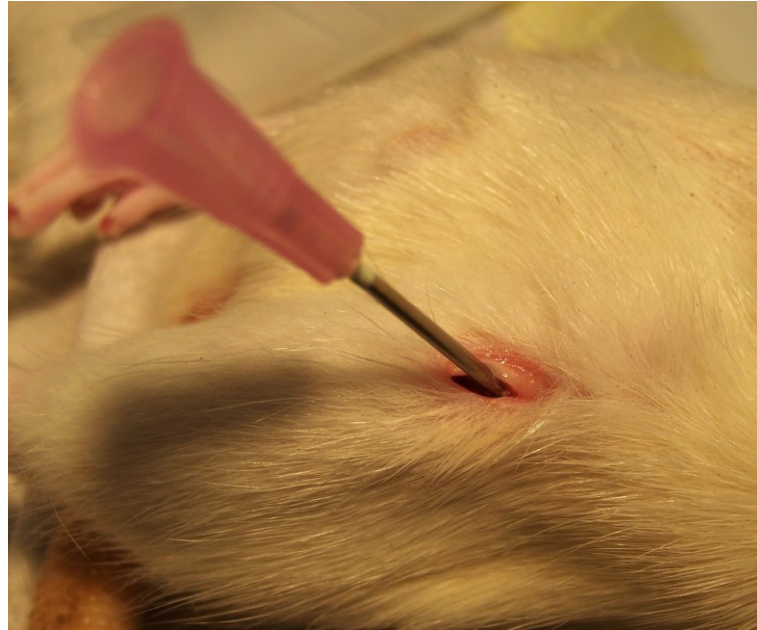
Wir wählten einen mikrochirurgischen Zugangsweg über das Kniegelenk durch eine Längsinzision von 1 cm präpatellar mittig. Es folgte das Aufsuchen und Darstellen des Ligamentum patellae mit einer seitlichen Längsinzision über ca. 5 bis 6 mm. Dieses führten wir sowohl an fünf Ratten jeweils von medial als auch fünfmal von lateral durch. Im weiteren Vorgehen wurde das Lig. patellae unterminiert und die Patella nach lateral respektive nach medial evertiert. Mit Hilfe einer Moskitoklemme wurden die Femurkondylen abgetastet und

dadurch die Identifikation der Interkondylären Notch (Kreuzbandhöhle) ermöglicht. Mit Hilfe der das Femur fixierenden Hand und dem Abtasten des Trochanter major erfolgte eine Identifikation der räumlichen Lage der Markhöhle in Relation zur Notch um eine zielgenaue Punktion der facies patellaris femoris (Abbildung 2) und Eröffnung der Markhöhle des corpus femoris zu ermöglichen. Dieses erfolgte durch Rotationsbewegungen mit einer Injektionskanüle mit 1,1 mm Außendurchmesser (Fa. BD, entspricht 19 Gauge, Farbcode nach EN ISO 6009: elfenbein), sowie 0,4 mm Außendurchmesser (grau, 27 Gauge) und 0,8 mm Außendurchmesser (grün, 21 Gauge) bis zur Perforation der Kortikalis, Penetration der cavitas medullaris und anschließendem Vorschieben unter leichten Drehbewegungen bis zum Anschlag der Kanüle (Abbildung 3)



**Abbildung 2: Blick auf Facies patellaris femoris nach Punktion**





**Abbildung 3: Minimalinvasiver Zugang, Kanüle steckt nach Punktion im Femur**

### **3.4.2 Tumorsimulation**

Um in Erfahrung zu bringen, wie wir eine kontaminationsfreie und luftdichte Applikation des Tumors gewährleisten können, simulierten wir die Applikation des Tumors. Hierfür orientierten wir uns an der Konsistenz von Zellkulturmedien wie z.B. RPMI und stellten eine Suspension aus Wasser und Albond Tortenguss klar (bestehend aus Stärke, teilweise modifiziert mit Gelatine) her. Um dieses sichtbar zu machen und somit abgrenzbar zu den übrigen Gewebsflüssigkeiten, versetzten wir den Tortenguss zusätzlich mit Tinte als farblichen Indikator (Abbildung 4).

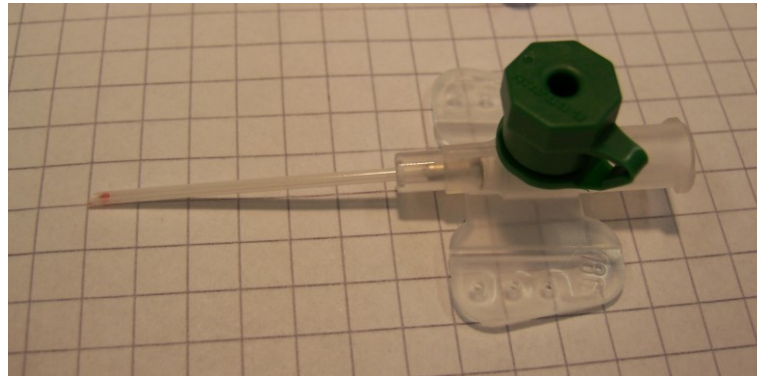


**Abbildung 4: Simulationstumor bestehend als Speisestärke und Tinte**

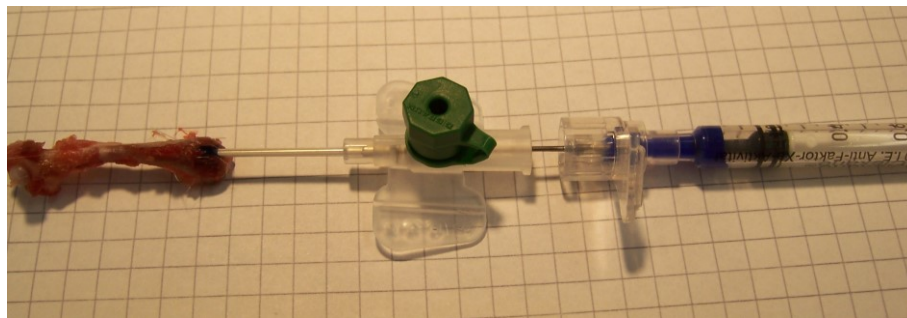
Der Simulationstumor wurde in einer 1 ml Clexane Spritze mit Spardorn abgefüllt. Wir punktierten jeweils 3 Femora mit einer 0,8 mm, 1,1 mm und 1,2 mm Außendurchmesser Kanüle und führten anschließend jeweils 0,9 mm, 1,1 mm und 1,3 mm Außendurchmesser Mandrins von peripheren Venenverweilkatheter durch den punktierten Kanal mit dem Ziel ein, eine luftdichte Verbindung zwischen Knochensubstanz und Mandrin zu erhalten. Anschließend applizierten wir mit viel Druck respektive wenig Druck auf den Spritzenstempel den Simulationstumor.

### **3.4.3 Diaphysäre Lage des Tumors**

Wir operierten erneut 6 Femora über den interkondylären Zugangsweg. Den Mandrin einer peripheren Venenverweilkanüle (Fa. BD, 1,3 mm Außendurchmesser, 18 Gauge, grün) kürzten wir auf 3 cm Länge (Abbildung 5) und führten ihn so in den intramedullären Schacht ein, dass 2cm herausstehen und somit 1 cm in die Markhöhle eindringen. Anschließend wurde mittels einer 1 cm hinter dem Mandrin herausschauenden Stahlkanüle 50 µl der Stärke (Simulationstumor) mit Hilfe der Clexane Spritze appliziert (Abbildung 6). So wollten wir erreichen, dass der Tumor direkt in der diaphysären Lage des Femurs appliziert wird.



**Abbildung 5: Mandrin des peripheren Venenkatheters auf 3 cm gekürzt**

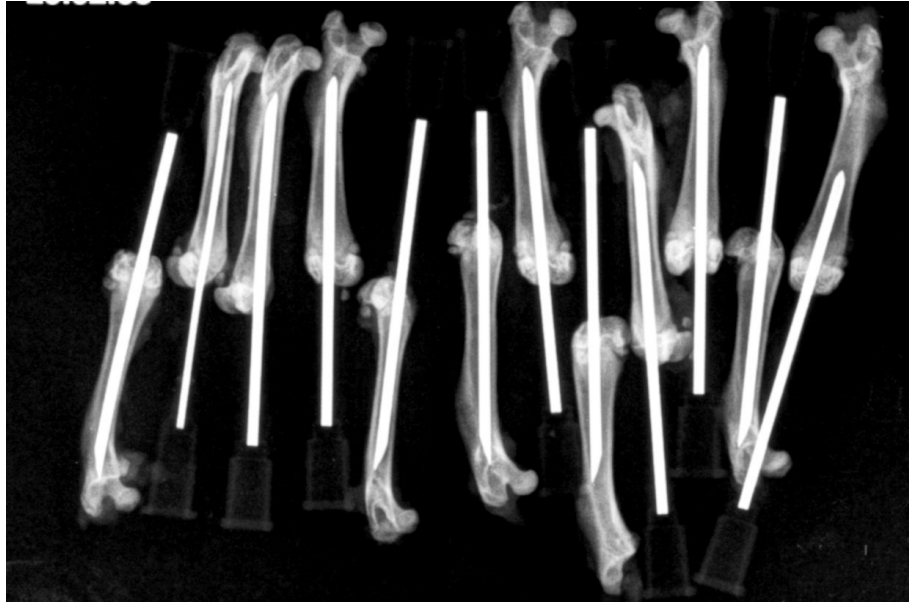


**Abbildung 6: Konstruktion aus Femur, Mandrin, Stahlkanüle und Tuberkulinspritze inkl. Simulationstumor. Das karierte Blatt dient als Maßangabe (2 Kästchen = 1 cm)**

#### **3.4.4 Ausmessen der Femur-Innenvolumina**

Zum Ausmessen der Innenvolumina erfolgte anhand von Röntgenaufnahmen von 12 Femora mit intramedullär verbliebener 1,1 mm Außendurchmesser Punktionskanüle bei 40 keV, 4,5 mAs und 1 m Abstand zur Strahlenquelle. Als Maßstabsangabe galt die Kanüle.

Wir führten dabei unter Rotationsbewegungen die Kanüle so tief ein, bis wir auf Widerstand durch die Corticalis auf Höhe des Trochanter major trafen (Abbildung 7).

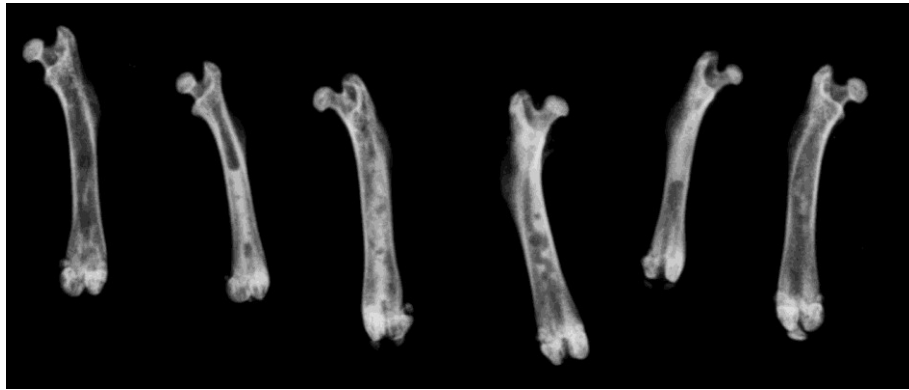


**Abbildung 7: Röntgenbild zum Ausmessen der Volumina**

### **3.4.5 Tumorsimulation mit Röntgen-Kontrastmittel**

Bei 6 weiteren Femora erfolgte der selbe operative Vorgang, diesmal jedoch mit der Applikation von dreimal 25  $\mu$ l und dreimal 50  $\mu$ l in den Kanal. Die zu applizierende Kuchenstärke wurde diesmal zusätzlich zur Tinte mit Visipaque 270, 250mg Iod/ml angefärbt, um diesmal per Röntgenkontrolle und Diaphanoskopie die Lage des Simulationstumors in dem Femur zu überprüfen. Hinzu kam der Verschluss der Punktionsstelle um einen möglichen Austritt des Tumors aus dem Femur zu verhindern. Wir testeten hierfür Knochenwachs und Vaseline, welche steril abgefüllt zur Applikation zu Verfügung stand. Nach Injektion der Stärke mittels Stahlkanüle der peripheren Venenverweilkanüle wurde das Lumen des Mandrins mit Hilfe einer weiteren Stahlkanüle mit Vaseline aufgefüllt und anschließend unter Druck durch eine mit Vaseline gefüllte Tuberkulin-Spritze in den Kanal injiziert. Dieses ermöglichte eine luftfreie Applikation der salbenartigen Konsistenz. Für das Knochenwachs verwendeten wir einen kleinen Stanzzylinder, welchen wir mit Hilfe der Kanüle in den Punktionskanal vorschoben.

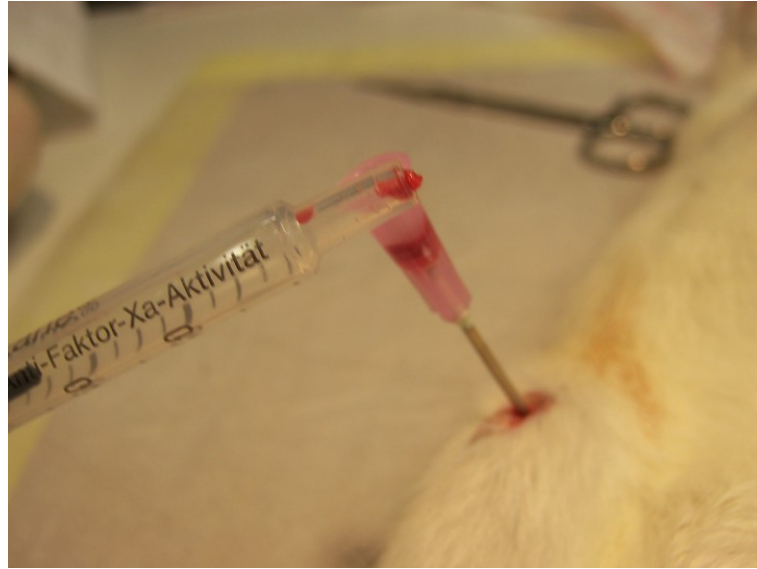
Anschließend haben wir die Femora bei 40 keV, 4,5 mAs und 1 m Abstand zur Strahlenquelle geröntgt (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Röntgenaufnahmen nach Applikation von Simulationstumor und Vaseline**

### **3.4.6 Verfeinerung der Tumorsimulation**

Als nächsten Schritt verfeinerten wir die Tumorsimulation mit 50  $\mu$ l flüssigem Tumor mit Iod als Kontrastmittel und anschließendem Verschluss der Eingriffsstelle mit Vaseline an 8 Femora. Das operative Vorgehen erfolgte wie bisher, diesmal allerdings mit Vorschieben des grünen Mandrins als Trokar bis zum Anschlag in die Markhöhle und Leersaugen der Markhöhle mit einer Clexane-Spritze (Abbildung 9). Nach Applikation des Tumors wurde eine weitere Stahlkanüle mit Vaseline aufgefüllt und unter Druck appliziert sowie zurückgezogen.



**Abbildung 9: Intramedulläre Gewebereste nach Aspiration in Tuberkulinspritze**

### **3.4.7 Ausschluß einer Perforation des Femurs**

Bei der anschließenden Tumorsimulation erfolgte nun der Vergleich von zwei verschiedenen Vorgehensweisen. Die erste Vorgehensweise vollzog sich wie bisher, außer dass explizit darauf geachtet wurde, dass sich die scharfkantige Kanülenspitze beim Vorschieben in der Markhöhle ausschließlich medial befand, um eine mögliche seitliche Perforation des Cortex auf Höhe des Trochanter major auf Grund der konvexen Form des Femurs zu vermeiden. Bei der zweiten Vorgehensweise wurde die facies patellaris mit einer rosa Kanüle (1,2 mm Außendurchmesser) nur ca. 1 cm tief punktiert bis zum Beginn des distalen Anteils der Markhöhle und anschließend erfolgte das Vorschieben des Mandrins einer peripheren Verweilkanüle (1,1 mm Außendurchmesser) als Trokar.

### **3.5 Zellkultur**

Die Chondrosarkom-Zellen Swarm Rat Chondrosarcoma wurden uns freundlicherweise von Prof. Gouin, Frankreich, bereitgestellt. Die Zellen zeigen das histologische Verhalten eines Grad II Chondrosarcoms und wurden bereits in anderen In-vitro-Studien verwendet (23, 25, 27).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach den standardisierten Bedingungen bei 95% Raumluft und 5% CO<sub>2</sub> bei 37 Grad Celsius im Labor der experimentellen Orthopädie des Universitätsklinikums Münster. Als Zellmedium wurde RPMI-1640 in Addition von 2 mmol/Liter L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, 0.25 µg/ml Amphotericin B sowie 10% Fetal Calf Serum (FCS) verwendet. Das Medium wurde jeden zweiten oder dritten Tag gewechselt.

In der weiteren Versuchsreihe verwendeten wir die Osteosarkom-Zelllinie UMR106-01, welche ein Subklon der UMR106-Zelllinie ist (22). UMR106 ist charakterisiert durch ein aggressives, hochproliferatives Wachstum mit einer geringen immunogenen Aktivität und einer hohen Rate an Lungenmetastasen. UMR106 stammt ursprünglich von einem osteogenen Nagetiersarkom mit osteoblastischem Phänotyp ab (41). Die Zelllinie wurde erstmals 2001 in einem Rattenmodell transplantiert (20) und wurde seitdem von anderen Arbeitsgruppen etabliert (10, 17, 47).

Die Anzucht erfolgte nach den standardisierten Begebenheiten und Abläufen in unserem Labor.

Diese bestehen aus 92% Umgebungsluft und 8% CO<sub>2</sub> im Inkubator bei einer ständigen Temperatur von 37 °C.

Die Anzucht erfolgte in Zellkulturflaschen in Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM)-Nährmedium mit 10% Fetal Calf Serum im Brutschrank. Das Medium wurde jeden zweiten oder dritten Tag gewechselt.

Die regelmäßige Aufteilung der adhärennten Zellen erfolgte nach Abziehen der Nährmediums, Spülen mit Phosphat Buffered Saline (PBS) und anschließendem Versetzen mit Trypsin-EDTA-Lösung. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde gewartet bis sich die Zellen lösten bevor der Split erfolgte.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe von Neubauer Zählkammern, um eine präzise Menge von  $5-6 \cdot 10^6$  Zellen zu erhalten.

Der andere Teil der Zellsuspension wurde weiter kultiviert um die Vitalität erfolgreich bestätigen zu können. Die Überprüfung auf Vitalität erfolgte erstens mit der positiven weiteren Anzucht, zweitens mit der im Weiteren bestehenden Adhärenz sowie drittens per Anfärben mit Trypanblau, welches als nicht membranfähiger Farbstoff nur Zellen mit defekter Zellmembran oder abgestorbene Zellen anfärbt.

### ***3.6 Phase 2: Erprobung an der lebendigen Ratten***

Nachdem sowohl die einzelnen Operationsschritte als auch die Tumorsimulation an der toten Ratte ausgiebig erprobt wurden, erfolgte die erste Probeoperation mit Implantation von Chondrosarkomzellen an einem lebenden Versuchstier.

Insbesondere erhofften wir uns neue Erkenntnisse im prä- sowie im intraoperativen Ablauf.

Erster Schritt war die Beschaffung und Mengenermittlung der zu verwendeten Materialien zum perioperativen Management der Versuchstiere sowie zur Verwirklichung des operativen Vorgehens. Um die Abläufe zu vereinfachen achteten wir auf eine möglichst vollständige Verwendbarkeit von Materialien aus dem klinischen Alltag.

Zur Abstimmung der einzelnen Arbeitsschritte ermittelten wir a) den Zeitbedarf für die Vorbereitung der Tiere bis zum Beginn der Narkose, b) die Zeitspanne vom Wirkungseintritt der Narkose bis zum Beginn der Operation und c) die Schnitt-Naht-Zeit. Insbesondere galt es in erster Linie die Zeitspanne von der Entnahme der Zellen aus der Kultur bis zur Inokulation zu minimieren.

Besondere Erfahrung galt es auch im Umgang mit der Narkose zu sammeln. Neben Fragen der Dosierung und Applikation standen ebenso die Wirkdauer sowie eine Antagonisierung im Mittelpunkt der Erarbeitung. Bei der Kombination der Sedativa und Analgetika Medetomidin und Ketamin bedarf es keiner künstlichen Beatmung der Versuchstiere, da es nicht zu einer lebensbedrohlichen Atemdepression kommen kann, und die Schutzreflexe weitestgehend erhalten bleiben. Die Antagonisierung der Narkose erfolgte mit Atipamezol. Die Applikation erfolgte jeweils mit einer 0,45mm s.c. Nadel in den Musculus quadriceps femoris des



kontralateralen Beines zur operierenden Seite. Um einem frühzeitigen Erwachen des Versuchstieres zeitnah entgegenwirken zu können wurde zuzüglich für den Bedarfsfall eine weitere Spritze mit den Sedativa bereitgelegt.

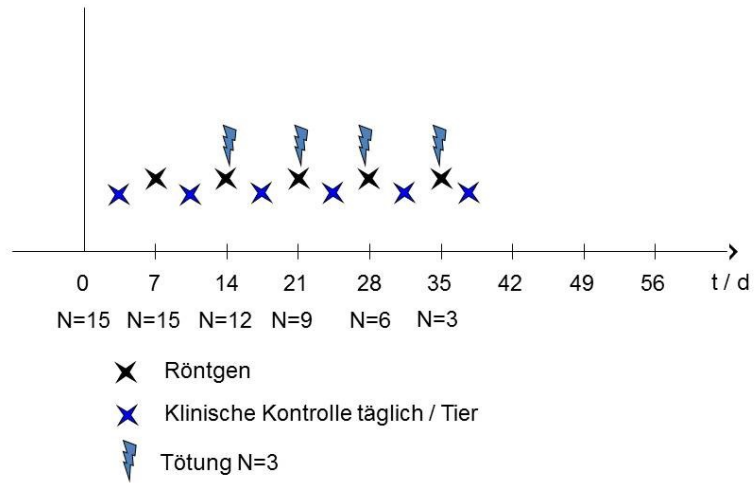
Zum Schutz der Cornea vor Konjunktividen bei fehlendem Lidschluss wurde diese intraoperativ mit einer entzündungshemmenden Dexpanthenol-Salbe bestrichen.

Die Lagerung der Ratten erfolgte zum Vermeiden eines peri-operativen Wärmeverlustes auf einem Wärmekissen in 135° - 180°-Rückenlage.

Zur Minimierung des postoperativen Wundinfektionsrisikos hielten wir uns an einen strikten Hygieneplan. Hierfür erfolgte die Depilation des Körperfells am zu operierenden Bein mit Enthaarungscreme. Anschließend erfolgte die dreimalige großzügige und großflächige Entfettung und Desinfektion des Operationsgebietes mit den Hautantiseptika Dihydrochlorid und Isopropanol. Es folgte das sterile Abdecken des Versuchstieres unter Aussparung des zu operierenden Beines mit einem sterilen Lochtuch. Des Weiteren verwendete der Operateur sterile Handschuhe sowie Mundschutz und Kittel.

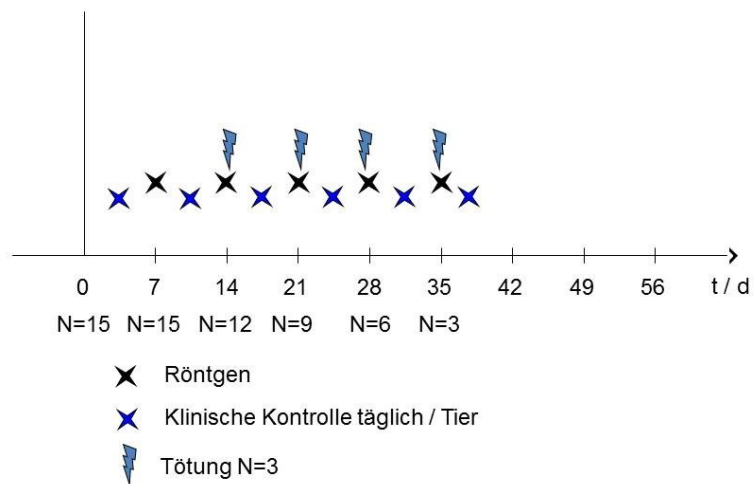
Das Studienprotokoll richtete sich sowohl für die Chondrosarkom- als auch auf für die Osteosarkomzelllinien nach den Angaben für die Zelllinienetablierung aus dem Tierversuchsantrag (Abbildung 10 und Abbildung 11).

**Phase 2 - Chondrosarkom**



**Abbildung 10: Studienprotokoll Zelllinienetablierung Chondrosarkom**

**Phase 2 - Osteosarkom**



**Abbildung 11: Studienprotokoll Zelllinienetablierung Osteosarkom**

Die Operation erfolgte anhand der erprobten Vorgehensweise aus der Entwicklung am toten Tier.

Die Inokulation der Zellen wurde ebenfalls unter sterilen Begebenheiten durchgeführt. Die zuvor klar definierte Zellzahl wurde als Zellsuspension vorsichtig in das Femur eingebracht. Das Risiko der Kontamination der angrenzenden Gelenke war neben dem Eintreten von Fett-, Tumor- sowie Luftembolien stets zu minimieren. Um die Vitalität der Zellen zu gewährleisten wurde die Zeit zwischen Gewinnung aus der Zellkultur und Einbringen in das Femur möglichst gering gehalten.

Sowohl der Kapselapparat als auch die Dermis wurden anschließend zur Reduktion möglicher Infektionsquellen sowie zur Wiederherstellung der anatomischen Begebenheiten mit jeweils ein bis zwei U-Haftnähten mit Prolene 5-0 FS bzw. Einzelknöpfen zugenäht.

Anschließend wurden die Versuchstiere vorsichtig in Einzelkäfige gebettet. Es erfolgte die Antagonisierung der Narkose mit Atipamezol perkutan in den Nacken. Über einen Zeitraum von 10 bis 20 Minuten kontrollierten wir den Rückgang der Sedierung sowie die Restitution der gewohnten Verhaltensweisen.

### ***3.7 Postoperativer Verlauf***

Die Ratten wurden postoperativ täglich bis zum Tag der Euthanasie beobachtet. Dabei wurden neben dem allgemeinen Gesundheitszustand, dem Sozialverhalten im Zweierkäfig ebenso spezielle Parameter zur Erkennung von Tumorwachstum überwacht.

Folgende Kriterien liegen der Einschätzung der Belastung zugrunde:

- Wir achteten darauf, dass eine Tumorgöße von max. 40 cm<sup>3</sup> nicht überschritten wurde.
- Eine Exulzerationen mit der Haut penetrierenden, ulzerierenden und gegebenenfalls superinfizierten Tumoren musste unbedingt vermieden werden.
- Bei dem täglichen Wiegen wurde ein Gewichtsverlust von max. 20 % toleriert.

Während der täglichen Kontrolle der klinischen Symptomatik der Versuchstiere waren insbesondere Zeichen von Apathie, auffallende Abwehrreaktionen oder Aggressivität bei Palpation des Tumors Zeichen für starke Schmerzen, stark verminderte Futter- und Wasseraufnahme, auffallende Atembeschwerden aufgrund der Ausbildung von Lungenmetastasen, motorische Auffälligkeiten aufgrund des Tumorwachstums mit Schonhaltung oder Hinken sowie unphysiologische, abnormale Körperhaltungen Zeichen für ein sofortiges Intervenieren.

Die postoperative Schmerzbehandlung erfolgte mittels Metamizol 110mg/kg Körpergewicht als subkutane Applikation. Überstiegen die Belastungen einen übermäßigen Grad erfolgte die Tötung der Tiere. Ebenso erfolgte das Töten der Versuchstiere sobald aufgrund des Tumorwachstums die Leiden der Tiere ethisch nicht vertretbar sind. Die schmerzlose Tötung der Ratten erfolgte durch Einleitung von CO<sub>2</sub> in den abgedichteten Käfig bis zum Eintritt der Asphyxie.

Alle Tiere wurden im Anschluss an die Tötung histopathologisch aufgearbeitet, um neben dem lokalen Tumorwachstum auch das Ausmaß und den Zeitpunkt der Lungenmetastasierung zu detektieren.

Einmal pro Woche erfolgte die Röntgenverlaufskontrolle der operierten Femora unter derselben Narkosedurchführung wie zur Operation.

### ***3.8 Phase 3: Modifikation mit Cyclosporin A***

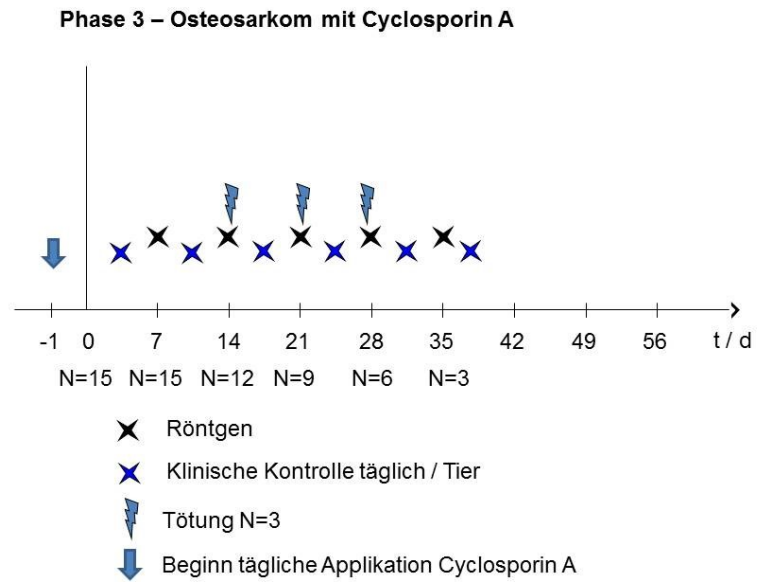
Aufgrund unseren Erfahrungen aus Phase 2 entschlossen wir uns dazu, das Modell um das Immunsuppressivum Cyclosporin A zu erweitern.

Hierbei sollte allen Tieren, denen Tumorzellen implantiert werden, eine 15-tägige peripoperative tägliche Cyclosporin Gabe verabreicht werden.

Die erste Applikation begann 1 Tag vor der Tumorzellimplantation.

Die tägliche Applikation erfolgte als intramuskuläre Gabe in einer Dosierung von 30 mg/kg Körpergewicht. Die Dosierung und Applikationsdauer des Cyclosporin A wurde abgeleitet von geeigneten Studien aus der aktuellen Literatur (2, 14, 53).

Das Studienprotokoll richtete sich für die Osteosarkomzelllinien nach den Angaben für die Zelllinienetablierung aus dem Änderungsantrag des Tierversuchs (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Studienprotokoll Osteosarkomzelllinie mit Cyclosporin A-Gabe**

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse Phase 1

Für die einzelnen Entwicklungsschritte an der toten Ratte gilt, dass die Erprobung der weiterführenden Vorgehensweise jeweils auf den Ergebnissen und Erfahrungen aus den vorhergehenden Untersuchungen aufbaute.

Es folgen die Ergebnisse der einzelnen Operationsschritte aus der Erprobung an der toten Ratte:

#### **Mikrochirurgischer Zugangsweg**

Der mikrochirurgische Zugangsweg präpatellar mittig stellt einen an unsere Ansprüche angepassten optimierten Zugangsweg dar. Der ca. 1 cm lange Hautschnitt ermöglicht ein sicheres Darstellen aller anatomischen Strukturen und einen guten Überblick für die weitere Operation bei gleichsam für das Tier schonender Vorgehensweise. So schützt ein minimalinvasives Vorgehen vor Infektionen und reduziert postoperative Komplikationen. Nach späteren Entwicklungsschritten zeigte sich, dass ein Verschluss mittels Hautnaht ebenso komplikationsfrei möglich ist.

#### **Evertieren der Patella**

Beim Unterhebeln und Evertieren des Ligamentum patellae zeigten sich keinerlei seitenabhängige nennenswerte Unterschiede in der Technik zur Darstellung der Facies patellaris. Im weiteren Vorgehen sahen wir jedoch Vorteile beim lateralen Evertieren. Aufgrund der anatomischen Strukturen und im Speziellen der intramuskulären Lage der Patella am Übergang Musculus quadriceps femoris zum Ligamentum patellae erleichterte ein laterales Evertieren die weiteren operativen Schritte. Auf diese Weise (in ca. 90° Flexionsstellung des Kniegelenks) kann die Patella so lateral der Ligamenta collaterale laterale fixiert werden. So wurde ein Zurückschnellen der Patella inklusive Ligamentum Patellae auf die Facies patellaris und somit auf das Operationsfeld ausgeschlossen.

### **Wahl einer geeigneten Punktionskanüle**

Bei der Punktion der Facies patellaris femoris untersuchten wir verschiedene Kanüledurchmesser. Eine s.c. 0,4 mm Nadel wurde verbogen, da die harte knöcherne Konsistenz einen zu großen Widerstand darstellte. Eine grüne 0,8 mm Nadel funktionierte problemlos, erzielte jedoch einen zu schmalen Punktionskanal mit einem zu geringen Lumen. Die 1,1 mm Kanülen (elfenbein) ließen sich unter leichtkreisenden Rotationsbewegungen sanft in den Markraum einführen und ermöglichten die sichere Applikation eines geeigneten Volumens.

Wichtig für die Punktion der Markhöhle ist die räumliche Orientierung. Es muss sichergestellt werden, dass man in Verlängerung der Cavitas medullaris die Kanüle platziert, um den intrakortikalen Raum ohne Perforation sicher zu treffen. Für die rosa Kanüle ergab sich in einer ersten Versuchsreihe bei 8 minimalinvasiven Eingriffen ein Fehler von 50%. Jeweils einmal entstand eine Querfraktur auf Höhe der Diaphyse und einmal durchstach die Kanüle parallel lateral das Femur und zweimal wurde durch die Notch auf die dorsale Seite punktiert. Bei 8 weiteren Punktionen gelangten 4 Punktionen nach Evertion der Patella nach lateral, beide Punktionen nach Evertion der Patella nach medial missglückten aufgrund von parallel lateralem Durchstechen des Femurs. Als Orientierungshilfe, um die Perforation zu verhindern, tasteten wir vor der Punktion mit Zeigefinger und Daumen das Femur auf Höhe des Trochanter major bei gleichzeitigem Ansetzen der Punktion am cranialen Teil der facies patellaris.

Ein erster Zeitbedarf des minimalchirurgischen Operationsablaufs der Punktion umfasste ca. drei bis sechs Minuten.

### **Simulationstumor**

Der nächste Schritt der Tumorsimulation lieferte Ergebnisse zu der Aufbereitung des Tumors, der Applikation sowie der intramedullären Ausbreitung. Der Tortenguss stellte dabei eine vergleichbare Konsistenz zum Nährmedium der Tumorzellen dar, das Versetzen mit blauer Tinte machte den Tumor für das Auge sichtbar. Dadurch konnten wir postoperativ eine zuvor nicht bemerkte Perforation oder Kontamination, z.B. im Kniegelenk, identifizieren.

### Ausmessen der Femurvolumina

Das Ausmessen der Innenvolumina erfolgte anhand von Röntgenaufnahmen von 12 Femora mit intramedullär verbliebener 1,1 mm Außendurchmesser Punktionskanüle bei 40 keV, 4,5 mAs und 1 m Abstand zur Strahlenquelle. Als Maßstabsangabe galt die Kanüle.

Länge des Kanals:

Minimal:	14,4 mm
Maximal:	29,4 mm
Median:	25,2 mm
Mittelwert:	24,2 mm

Dieses entspricht einem Volumen  $\pi \cdot r^2 \cdot h$  von:

Minimal:	54,6 mm <sup>3</sup>
Maximal:	111,4 mm <sup>3</sup>
Median:	95,5 mm <sup>3</sup>
Mittelwert:	91,7 mm <sup>3</sup>

Zu berücksichtigen ist, dass aufgrund der anatomischen Konfiguration des Femurs die Kanüle nie den gesamten intramedullären Raum ausfüllen kann, sondern noch freies Volumen durch die Knochenbälkchen um die Kanüle herum gebildet wird und unser ermitteltes Volumen somit nur eine Annäherung darstellt.

Laut Angaben der Apotheke beträgt das kleinstmögliche zu applizierende Volumen 50 µl. Dieses stellt die Menge eines Eichstrichs auf einer 1ml Tuberkulinspritze dar. Dieses von uns



auch verwendete Volumen entspricht  $50 \text{ mm}^3$  und findet nach Applikation somit sicher im Femur Platz.

### **Diaphysäre Lage und Luftdichte durch Mandrin-Konstruktion**

Der von uns mit der Kanüle gebohrte Kanal durch die facies patellaris hat einen Durchmesser von 1,1 mm. Durch diesen lässt sich anschließend problemlos der zugehörige Mandrin der 1,1 mm Außendurchmesser Stahlkanüle vorschieben. Da dieser die 1,1 mm Stahlkanüle umschließt, hat er einen etwas größeren Außendurchmesser als die zugehörige Stahlkanüle. Dieses sorgt für einen luftdichten Abschluss zwischen Knochensubstanz und Mandrin und verhindert ein Austreten des Tumors während der Applikation in das Kniegelenk.

Die Kanüle darf nicht tiefer als 1 cm eingeführt werden. Es zeigte sich bei 4 Femora eine Perforation der Kortikalis am Schenkelhals und bei 3 Femora eine Perforation an der Konvexseite (Abbildung 13). Alle wurden durch die Spitze der Kanüle bei zu tiefem Vorschieben unter Rotationsbewegungen verursacht. Durch das Einführen von lediglich 1 cm der Kanüle verhindert man diese Fehlerquellen. Das Punktieren und Vorschieben mit der angeschliffenen Kanülenspitze zur medialen Seite stellte sich als komplizierter dar, da durch die nicht mögliche Rotationsbewegung die Punktion erschwert wurde.

Die Markhöhle hat im Mittel eine Länge von 24,3 mm. Bei Einführen von 1 cm des auf 3 cm gekürzten Mandrin können wir eine diaphysäre Applikation des Tumors sicherstellen und eine Kontamination des Kniegelenks ebenso ausschließen wie den Austritt des Tumors durch eine Perforation auf Höhe des Schenkelhalses und somit eine Kontamination des Hüftgelenks.



**Abbildung 13: Femur nach Punktion - deutlich zu erkennen ist der Austritt des blauen Simulationstumors am proximalen Abschnitt durch Perforation der Corticalis**

#### **Aussaugen des Lumens**

Das Ausmessen der Markhöhle ergab ein Volumen von im Mittel 91,7  $\mu\text{l}$ . Um dieses zu erhalten, damit die kleinste geeichte mögliche Menge von 50  $\mu\text{l}$  diaphysär appliziert werden kann, schoben wir den Mandrin stumpf bis zum Anschlag in der Markhöhle vor. Um das Material des Mandrins beim Zerborsten der Spongiosa zu schonen, führten wir die Stahlkanüle als Trokar ein, ohne jedoch die Kanülenspitze an der Spitze des Mandrins der Spongiosa zu exponieren. Anschließend wurde die Stahlkanüle entfernt und eine Clexane-Spritze auf dem Mandrin platziert. Unter Sog und Zurückziehen des Mandrins ermöglichte es uns auf diese Weise das Entfernen der Spongiosa- und Knochengewebsstrukturen.

#### **Applikationsvorgang und Verschluss des Punktionskanals**

Der Tumor muss luftfrei in die Tuberkulinspritze aufgezogen werden. Nur so kann sichergestellt werden, dass die zu applizierende Menge auch tatsächlich vollständig an ihren Bestimmungsort befördert werden kann. Während der Applikation darf nur wenig Druck auf den Spritzenstempel aufgebaut werden. Bei zu großem Druck zeigte sich ein Austreten des Simulationstumors während des Zurückziehens am Knie.

Um das Austreten des Simulationstumors aus dem Femur nach der Applikation zu verhindern, verschlossen wir den Punktionskanal. Das Knochenwachs als Stanzzylinder zeigte sich hierfür als wenig gut handhabbar, da er aufgrund seines kleinen Volumens bei gleichzeitig klebriger Konsistenz nur unter größten Bemühungen sicher in den kleinen Punktionskanal befördert werden konnte.

Als eleganter präsentierte sich die Applikation der Vaseline mittels Stahlkanüle. Nach gefühlvollem Druckaufbau auf dem Spritzenstempel und Einführen der Stahlkanüle in den Punktionskanal konnten wir ein kleines Volumen zum Verschluss applizieren.

### **Applikationsmenge und diaphysäre Lage in der Röntgen-Kontrolle**

Anhand von durchgeführten Röntgenbildern bei 12 Femora überprüften wir die korrekte diaphysäre Lage des Tumors und das Verhalten der Vaseline als Knochenverschluss.

Es zeigte sich bei 3 Femora ein diaphysär gelegener röntgendichter Bereich, der in Richtung Knie durch Vaseline dicht verschlossen ist (Abbildung 14).

Bei einem weiteren Femur befindet sich die Lage des Simulationstumors zu weit cranial (Abbildung 15).

In drei weiteren Fällen konnten wir beobachten, dass die applizierte Vaselineintramedullär den Simulationstumor verdrängte, weil zu viel appliziert wurde (Abbildung 16).

Bei 3 weiteren ergab sich keine klare Abgrenzung zwischen Markraum, Simulationstumor und Vaseline (Abbildung 17).

In den übrigen konnte kein Röntgenkontrastmittel intramedullär abgebildet werden (Abbildung 18).



Abbildung 14: Simulationstumor diaphysär



Abbildung 15: Simulationstumor cranial



Abbildung 16: Vaseline diffus intra-medullär



Abbildung 17: keine klare Abgrenzung möglich



Abbildung 18: kein Nachweis von Kontrastmittel

Die Diaphanoskopie liefert bei der Durchlichtmikroskopie keine Ergebnisse. Unter dem Auflichtmikroskop konnte man teilweise die durch die blaue Tinte gefärbte Stärke sehen. Die Methode eignet sich jedoch nicht für eine genaue Bestimmung der Größe und Lage des Simulationstumors.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse ergaben sich folgende Schlussfolgerungen für eine optimale Operation an der Ratte:

#### ***4.2 Operation Schritt für Schritt***

Die Kriterien, die eine Ratte erfüllen musste, um operiert werden zu können, wurden folgendermaßen festgelegt:

- 1) männliche mind. 4 Wochen alte Sprague-Dawley Ratte
- 2) der Allgemeinzustand durfte keine Anzeichen auf eine Erkrankung erkennen lassen

Erfüllte die Ratte diese Kriterien, wurde sie für die Operation ausgewählt.

Die zu operierenden Versuchstiere wurde gewogen und die vorhandene Markierung zur korrekten Zuordnung überprüft.

Operiert wurde in den Versuchslaboren im Tierstall des Universitätsklinikums Münster unter sterilen Bedingungen.

Das Material wurde sorgsam auf Haltbarkeit, Vollständigkeit und Unversehrtheit überprüft und vorbereitet.

Zur Narkoseeinleitung wurde in eine „EcoJet Plus“ 1 ml Tuberculinspritze mit Spardorn Medetomidin (0,05 ml/kg Körpergewicht) sowie Ketamin (0,075 ml/kg Körpergewicht) zur Narkose und Analgesie aufgezogen. Ebenso wurden in einer zweiten Tuberculinspritze ein Drittel der Initialdosis der Narkotika für eine mögliche Prolongation der Narkose sowie in einer

dritten Tuberculinspritze zur Antagonisierung Atipamezol (0,02 ml/kg Körpergewicht) bereitgestellt.

Es erfolgte die Narkose und Analgesie mittels intra-muskulärer Applikation mit einer Microlance 0,45 mm s.c.-Kanüle (Fa. BD) in den musculus quadriceps femoris des kontralateralen Beines zur operierenden Seite. Durch die Auswahl der beiden Narkotika Medetomidin und Ketamin wurde eine Beatmung während der Narkose überflüssig, da es bei dieser Kombination nicht zu einer lebensbedrohenden Atemdepression kommt. Zum Schutz der Cornea wurde Bepanthen Augensalbe (Fa. Bayer) aufgetragen.

Mittels Haarentfernungs-Creme (Fa. Veet) konnte nach fünfminütiger Einwirkzeit das zu operierende Bein großzügig von Haaren befreit werden und anschließend dreimalig mit Octeniderm (Fa. Schülke) und Cutasept G (Fa. Bode) unter Beachtung der Einwirkzeiten desinfiziert werden.

Die Ratte wurde anschließend auf einem Wärmekissen in Rücken-Seit-Lage platziert und mit einem sterilen Lochtuch Klinidrape 30x30cm unter Ausschluss des zu operierenden Beines abgedeckt (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Lagerung und steriles Abdecken**



**Abbildung 20: Hautschnitt**

Der Hautschnitt erfolgte präpatellar ca. 1 cm lang bis auf die Fascie (Abbildung 20). Anschließend Längsinzision seitlich des Ligamentum patellae, Untermination und Evertion der Patella nach medial mit Darstellung der Facies patellaris und Interkondyläre Notch (Abbildung

21). Es folgte das Tasten und Fixieren des Trochanter major und Punktion in Verlängerung der Facies patellaris mit einer 1,1 mm Außendurchmesser Kanüle (Farbcode: elfenbein) (Abbildung 22). Die Punktion erfolgte unter leichtem Druck und gefühlvollen Rotationsbewegungen bis zu einer Eindringtiefe von 1cm.



**Abbildung 21: Darstellen des lig. patellae**



**Abbildung 22: Punktion der facies patellaris femoris**

Als nächstes wurde der Mandrin einer 1,1 mm peripheren Venenverweilkanüle (Farbcode: rosa) mit der etwas zurückgezogenen korrespondierenden Stahlkanüle als Trokar stumpf bis zum Anschlag respektive bis zum Anstoßen auf Widerstand in die Markhöhle eingeführt. Mit Hilfe einer Tuberkulinspritze wurden lockere Gewebebestandteile unter Sog aus der Markhöhle entfernt. Der Mandrin wurde bis auf ca. 1 cm aus dem Femur hinausgezogen.

Der Tumor wurde anschließend mit Hilfe einer weiteren Tuberkulinspritze und einer Stahlkanüle appliziert (Abbildung 23) bevor nach Entfernen des Mandrins der Punktionskanal mit Vaseline per Stahlkanüle verschlossen wurde (Abbildung 24). Letztendlich wurde die Patella auf ihrer Facies articularis platziert.



**Abbildung 23: Inokulation von Tumorsuspension**



**Abbildung 24: Verschluss mit Vaseline**

Es folgte die Fasciennaht mit rückläufiger U-Haftnaht mit Prolene 5-0 FS (Abbildung 25) sowie die Cutisnaht mit ein bis zwei Einzelknöpfen (Abbildung 26).



**Abbildung 25: Fasciennaht**



**Abbildung 26: Hautnaht**

Die Haut wurde von eventuellen Blutresten gereinigt, die Tücher entfernt und mit subcutaner Injektion im Nackenbereich die Antagonisierung durchgeführt. Die Ratte wurde im separaten Käfig zum Aufwachen positioniert und bis zum Aufwachen überwacht.

Die Operation dauerte ca. 3 bis 5 Minuten.



### ***4.3 Ergebnisse Phase 2***

Wir operierten 15 Ratten und implantierten ihnen Chondrosarkom-Zellen in jeweils beide Femora. Ein Versuchstier verstarb intraoperativ und drei im Rahmen der Narkose für die Röntgenverlaufskontrolle. Drei Tiere überlebten als Langzeitstudie bis zu 14 Wochen.

Von uns wurden 23 Ratten operiert und Osteosarkom-Zellen implantiert, davon bei 16 Tieren an beiden Femora. 2 Tiere verstarben intraoperativ, 1 Tier nach Applikation des Antisedan postoperativ und eine Ratte während der Narkose für die Röntgenverlaufskontrolle. 3 Tiere überlebten als Langzeitstudie bis zu 12 Wochen.

Die postoperativen Verlaufskontrollen lieferten bei allen operierten Ratten- sowohl mit Chondrosarkomzellen als auch mit den hochproliferativen Osteosarkomzellen - keine Hinweise auf Tumorwachstum.

Als klinische Zeichen beobachteten wir dabei das Verhalten der Ratten auf Anzeichen von Mobilitätseinschränkungen oder verändertem sozialen Verhalten sowie visuelle und palpatorische Veränderungen an dem operierten Femur im Sinne einer Raumforderung, welche auf ein Tumorwachstum hätte zurückschließen lassen können.

Bei der radiologischen Verlaufskontrolle zeigte sich bei allen operierten Ratten - sowohl mit Chondrosarkomzellen als auch mit den hochproliferativen Osteosarkomzellen - kein Anhalt für ein Tumorwachstum.

Bei der Nekropsie konnten weder im Femur pathologische Veränderungen festgestellt werden noch gab es Anhalte für Metastasen in der Lunge.

### ***4.4 Ergebnisse Phase 3***

Anhand des Protokolls (siehe 3.7) überwachten wir die Ratten nach der Inokulation der Zellen des hochproliferativen Osteosarkoms.

Klinisch fielen die Ratten bereits nach 7 Tagen postoperativ durch einen raumfordernden Prozess an dem operierten Femur auf. Im Durchschnitt zeigten sich erste klinische Zeichen des Tumorwachstums nach 11,5 Tagen.

In der Palpation hatte dieser einen derben, gallertigen Charakter. Dieses ging einher mit einer asymmetrischen Bewegungsstörung.

In der klinischen Untersuchung präsentierten die operierten Ratten auch optisch eine Größenzunahme des operierten Oberschenkels mit einer ausgeprägten Weichteilkomponente bereits ab 7 Tagen postoperativ (Abbildung 27).

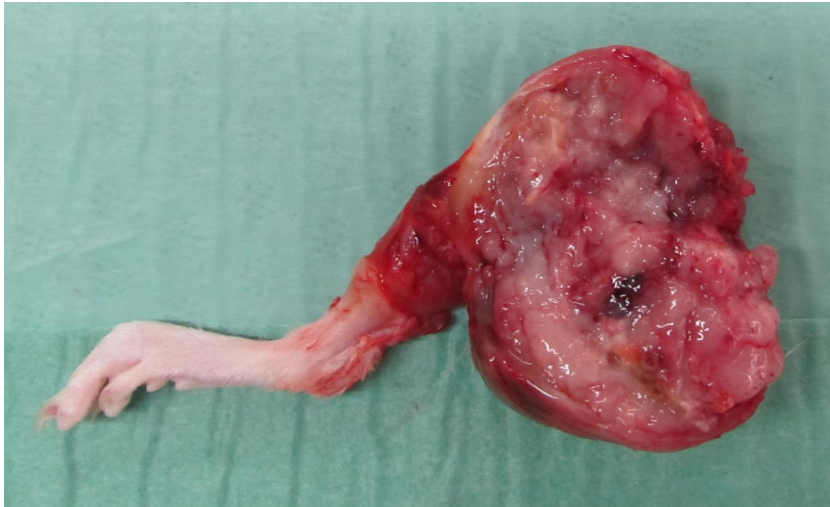
Im Sozialverhalten erkannten wir keine Veränderungen im Sinne von aggressivem oder asozialem Verhalten, welches auf Schmerzen oder eine starke Beeinträchtigung hätte zurückschließen lassen können.



**Abbildung 27: Ratte mit deutlich sichtbarer Weichteilkomponente des lokalen Tumorwachstums an der von Fell befreiten hinteren Extremität**

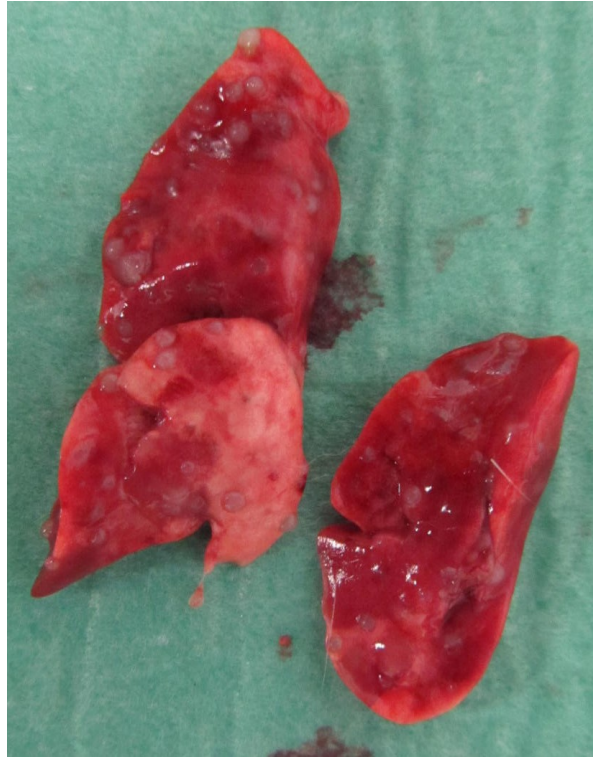
Von 18 operierten Ratten sind 3 intraoperativ verstorben. Von den verbliebenen 15 präsentierten 13 Ratten (86,6%) ein lokales Tumorwachstum im operierten Femur und hiervon 100% eine pulmonale Metastasierung.

Makroskopisch zeigte sich post-mortem in dem operierten Femur eine ausgeprägte Weichteilkomponente mit einer diffusen Osteoidbildung sowie einer auffallenden Neovaskularisation (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Makroskopische Sicht auf die eröffnete Weichteilkomponente**

In dem Präparat der beiden Lungenflügel präsentierte sich eine Vielzahl von grauweiß-glasigen Rundherden (Abbildung 29).



**Abbildung 29: Makroskopisch deutlich sichtbare Rundherde in beiden Lungenflügeln**

In der radiologischen Verlaufskontrolle zeigten sich die typischen Zeichen eines malignen Tumors im Knochen (Abbildung 30 und Abbildung 31). Im befallenen Femur stellte sich gleichsam ein Wechsel aus osteolytisch- und osteoblastischen Bereichen dar. Neben der Zerstörung der trabekulären Struktur des Knochens durch Osteolysen zeigten sich Arrosionen der Kortikalis und periostale Zeichen mit abgehobenem Periost und periostaler Knochenbildung. Die ausgeprägte Weichteilkomponente war nicht klar vom umliegenden Gewebe abgrenzbar und enthielt eine diffuse Osteoidbildung.

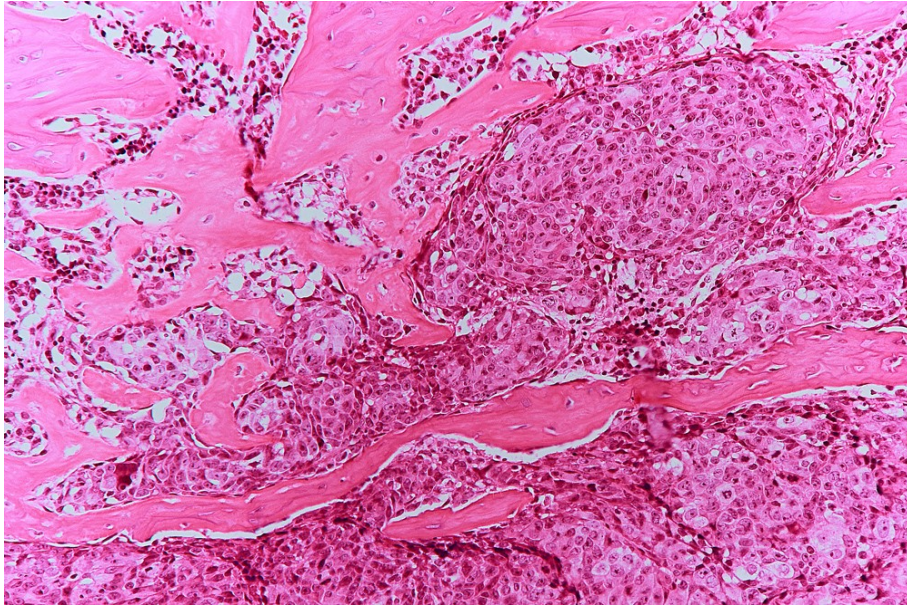


**Abbildung 30: Radiologisch sichtbare Periostabhebung mit Weichteilkomponente**

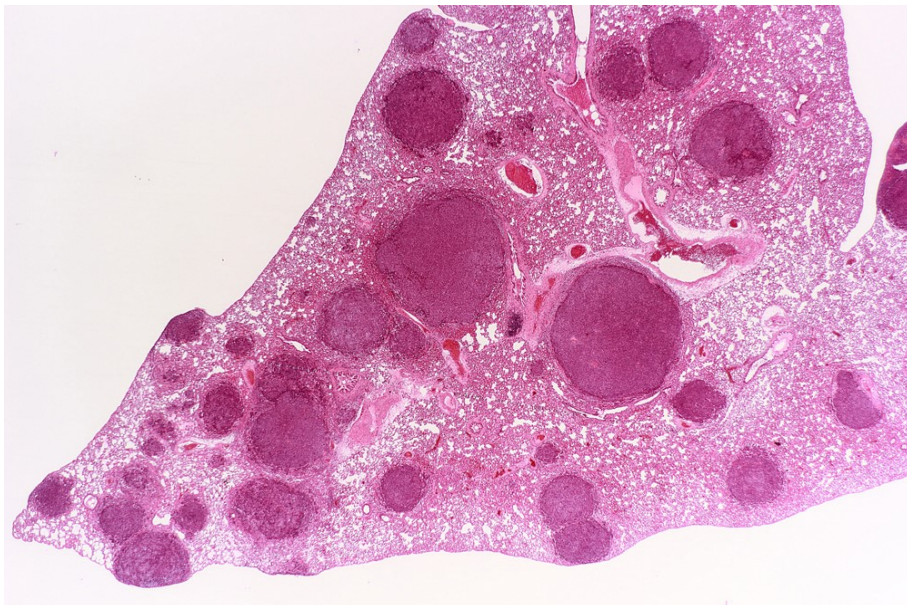


**Abbildung 31: Ausgeprägte Weichteilkomponente, Durchbrechung der Kortikalis und Osteolysen**

In der Histologie zeigten sich atypische, polymorphe Tumorzellen mit irregulärer netzartiger Bildung von primitivem Faserknochen. Es konnten vermehrt Mitosen nachgewiesen werden (Abbildung 32). Ebenso präsentierte die histologische Aufarbeitung der Lungenpräparate typische Osteoidbildung im Sinne von Metastasen (Abbildung 33). Beide Präparate wiesen Zellen mit den typischen Charakteristika eines Osteosarkoms auf (44).



**Abbildung 32: Histologie des Osteosarkoms**



**Abbildung 33: Histologie der Lungenmetastasen**

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, ein Tiermodell zur Erforschung neuer Therapieansätze der Knochensarkom-Therapie zu entwickeln. Das Modell sollte reproduzierbares Tumorwachstum erzielen, welches sich wie ein Abbild der pathophysiologischen sowie histologischen Eigenschaften der Knochensarkome des Menschen verhält. Als neuen Therapieansatz erhofften wir uns im Speziellen neue Erkenntnisse in der Verwendung von Bisphosphonaten.

### 1) Neue Therapieansätze für die Behandlung von Knochensarkomen mit Bisphosphonaten

Das Chondrosarkom ist der zweithäufigste primäre Knochentumor (16). Typisches histologisches Muster sind sich langsam teilende Zellen umgeben von hyaliner Matrix in lowgrade Tumoren (28), vermehrte Nekrosen und Mitosen zeigen sich in high-grade Tumoren (58). Die weite chirurgische Tumorresektion ist die einzige etablierte kurative Therapieoption der höhermalignen Chondrosarkome dar (50). Die insuffizienten adjuvanten Therapieoptionen mittels Chemotherapie und Strahlentherapie insbesondere der hochmalignen Chondrosarkome führen zu unbefriedigenden Ergebnissen bezüglich der 5-Jahre-Überlebensrate und trotz adäquater weiter Tumorresektion treten in bis zu 25% der Fälle Lokalrezidive auf, 49% bis 73% der Patienten mit Lokalrezidiv entwickeln Metastasen (19, 39). Die Entwicklung neuer effektiver adjuvanter Therapieoptionen ist daher unumgänglich, um die Prognose dieser Patienten signifikant zu verbessern.

Osteosarkome stellen den häufigsten primären Knochentumor mit einem Häufigkeitsgipfel im Jugendalter und einem bei Erwachsenen über 65 Jahren dar (43) und sind charakterisiert durch Osteoidbildung und Remodelling der Knochenmatrix (54). Die derzeitige Therapieempfehlung des high-grade Osteosarkoms liegt, abhängig vom genauen Staging, in der neoadjuvanten Chemotherapie gefolgt von einer weiten En-bloc-Resektion und einer adjuvanten Chemotherapie. Als neue Therapieoptionen wurden hier die Bisphosphonate in Betracht gezogen und zeigten bereits in einer Studie, dass sie keinen negativen Einfluss auf das Outcome der Chemotherapie haben und die Beständigkeit der operativen Rekonstruktion verbessern (42). Aktuell wird überlegt, die Bisphosphonate als additives Medikament im

Rahmen der Neuauflage der EURO-B.O.S.S. Protokolle mit aufzunehmen. Analog dazu finden die Bisphosphonate in der Neuauflage der Euro Ewing 2012-Studie bereits Anwendung (7).

Die Weiterentwicklung von adjuvanten Therapie-Schemata der Knochensarkome richtet sich vor allem auf die Bereiche der Chemotherapeutika, der Immun- und Strahlentherapie. Für das Chondrosarkom beschreiben Studien die Verwendung von Anti-Angiogenesefaktoren (46) oder von Cyclooxygenase-2-Hemmern (COX-2-Hemmer) in Verbindung mit Chemotherapien (62). Hier zeigt sich unter der Verwendung von COX-2-Hemmern nach beginnender Tumorreduktion jedoch nach 6 Wochen ein erneute Tumorzunahme (52). Aber auch neue medikamentöse Ansätze mit Bisphosphonaten kommen vermehrt zur Anwendung (60).

Die mit diesem Tiermodell zu untersuchende Medikamentengruppe und deren Eigenschaften auf unterschiedliche Knochentumoren sind die Bisphosphonate. Diese teilen sich in zwei Hauptgruppen auf, die Nichtamino-Bisphosphonate und die Amino-Bisphosphonate. In beiden Hauptgruppen gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Vertreter, die sich auf verschiedenen Gebieten der Medizin im Einsatz befinden. Die Wirkung liegt in der Verminderung der Knochenresorption und der Erhöhung der Mineralisation des Knochens. Der Wirkmechanismus liegt dabei in der Inhibition der Osteoklastenaktivität durch Minderung der Oberflächenadhäsion zum Knochen sowie Herbeiführen der Apoptose der Osteoklasten (21, 29, 51). Neben dieser Beeinflussung des Knochenstoffwechsels zeigen weitere Studien einen direkten tumortoxischen Effekt der Bisphosphonate auf. Diese Effekte werden durch verschiedenste Wirkmechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene hervorgerufen. Hier zeigten Zellkulturversuche eine potentielle Wirksamkeit der Bisphosphonate gegenüber Osteosarkomzellen sowie die zytotoxische Wirkung auf Chondrosarkomzellen (33, 36, 56, 60).

Die Bisphosphonate werden schon lange erfolgreich insbesondere bei Erkrankungen des Skelettsystems eingesetzt. Bisphosphonate haben jedoch auch in der Tumormedizin einen wichtigen Stellenwert eingenommen. So werden Bisphosphonate nicht nur in der Therapie benigner Knochenerkrankungen wie der Osteoporose, der Fibrösen Dysplasie oder der Osteogenesis imperfecta eingesetzt, sondern werden mittlerweile auch als Standardtherapeutika in der Behandlung maligner metastatischer Knochenerkrankungen verwendet. Wie bereits beschrieben konnte ein positiver Effekt der Bisphosphonat-Therapie auf die Tumorerkrankung bzgl. verschiedener Parameter, wie z.B. dem Auftreten und der Anzahl von skeletal related events (SRE), der Anzahl an neuen Knochenmetastasen oder auch



der Schmerzsymptomatik der Patienten ausgemacht werden (1, 3, 8, 11, 48). Insgesamt zeigte sich bei einem Großteil der Patienten durch die oben beschriebenen Effekte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit sowie eine Verbesserung der Lebensqualität (12).

Dieses mit dieser Arbeit entwickelte Modell legt die Grundlage, um neue therapeutische Ansätze in der Therapie der Knochensarkome zu erforschen. In erster Linie erhoffen wir uns neue Erkenntnisse in der Therapie mit Bisphosphonaten, um die Prognose der betroffenen Patienten zu verbessern.

## **2) Entwicklung eines geeigneten Tiermodells**

Bei der Entwicklung eines geeigneten Tiermodells spielen unterschiedliche Faktoren und Anforderungen eine Rolle. Jeder einzelne Aspekt muss im Kontext zu unseren Ansprüchen und Möglichkeiten - wie bereits in den Anforderungen an das In-vivo-Modell zuvor beschrieben wurde - beurteilt werden, um ein ideales, standardisiertes und reproduzierbares Modell zu erhalten.

Folgende Faktoren spielen bei der Entwicklung eine besondere Rolle:

Die Theorie des Modells stellen die grundlegenden Faktoren dar. Dieses betrifft auf der einen Seite die Vergleichbarkeit mit bereits in der Literatur vorhandenen Modellen. Außerdem ermöglicht es uns somit auf bereits bestehende Daten und Erfahrungen mit Bisphosphonaten als Osteoklasteninhibitoren zurückzugreifen. Auf der anderen Seite sollen die pathophysiologischen und histologischen Eigenschaften des Tumors dem menschlichen Knochensarkom möglichst präzise entsprechen und die in einem späteren Schritt zu erwartenden Ergebnisse der Interventionen am Modell, z. B. mit Bisphosphonaten oder nach tumororthopädischen Interventionen, auf den Menschen übertragbar sein.

Weitere wichtige Faktoren beziehen sich insbesondere auf den operativen Zugangsweg und die Applikation der Tumorzellen. Im Einzelnen bezieht sich dieses sowohl auf den Umgang mit dem Versuchstier und den damit verbundenen ethischen Rahmenbedingungen als auch auf das Erzielen eines stabilen und reproduzierbaren Tumorwachstums sowie gleichermaßen auf die Vorbereitung, Anzucht, Vitalität und sterile Inokulation der Tumorzellen. Schließlich muss

das Versuchstier derart geeignet sein, dass ein operativer Umgang sowie eine spätere mögliche tumororthopädische Intervention mit geringem Aufwand möglich sind.

In der Literatur wurden bereits verschiedene Tiermodelle zur Untersuchung von primären und sekundären Knochentumoren beschrieben, welche sich nicht explizit für unsere Fragestellungen eignen, auf deren Ergebnisse sich die Entwicklung unseres Modells jedoch stützt und auf deren Erfahrungen wir zurückgegriffen haben.

Eine mögliche Vorgehensweise stellt die lokale iatrogene Applikation von Tumorzellen in lange Röhrenknochen, den linken Ventrikel, subcutan oder in Blutgefäßen dar (6, 9, 40, 49). Die Gemeinsamkeiten dieser Modelle sind a) die durch eine Feinnadel applizierten Tumorzellen der gleichen Spezies und b) das Versuchstier (allogene Transplantation), wodurch eine hämatogene Metastasierung und der damit verbundenen Knochendestruktion durch zumeist osteolytische (z.B. Mamma-Karzinom) oder osteoblastische (z.B. Prostata-Karzinom) Tumoren imitiert wird. Sowohl das Osteosarkom als auch das Chondrosarkom gehen mit teils osteolytischen, teils auch mit osteoblastischen Knochendestruktionen einher und lassen somit einen Interpretationszusammenhang zu unserem Modell zu.

Nachteile dieser Modelle sind jedoch: a) das Fehlen eines primären Knochentumors, der mit einem Wachstumsmuster vergleichbar zum Menschen einhergeht und ein typisches sekundäres Metastasierungsmuster aufzeigt, b) die weite Verteilung der applizierten Zellen im Versuchstier ohne klar reproduzierbare Lokalisationen.

Ein intramedulläres Metastasenmodell eines osteolytischen Osteosarkoms beschrieb A. Kurth et al 2001 (35) erstmals an dem Versuchstier Ratte und bezog sich hierbei auf einen Vortrag von C.A. Leal et al aus dem Jahr 1995 (38). A. Kurths Ziel war es, Knochendichtemessungen und strukturelle Veränderungen bedingt durch osteolytischen Metastasen zu untersuchen. Hierfür benötigte er ein reproduzierbares Tumorwachstum im Femur von Ratten. Als Zugangsweg zur iatrogenen Inokulation wählte er einen parapatellaren Zugang zum Femur mit Dislokation der Patella. Anschließend wurde der Markraum mit einem 0,035 Kirchner-Draht durch die Notch punktiert, die Tumorzellen in einer Zellenanzahl von  $2 \cdot 10^6$  in 0,6% Agarose als Stanzzyylinder mittels Kanüle eingebracht, der Zugangsweg mit Knochenwachs verschlossen und zuletzt der Extensorenapparat wieder hergestellt. Um eine Beeinträchtigung der Versuchstiere durch neu auftretende Metastasen in Lunge oder Leber zu vermeiden, wurde deren Tod nach 28 Tagen Untersuchungszeitraum ab Operation herbeigeführt.

Die Arbeitsgruppe um B. Cherrier et al veröffentlichte 2005 ein angepasstes Modell zur Untersuchung des Osteosarkoms (10). Sie beschreiben die Applikation von 200 µl 1,2% Alginatlösung mit  $4 - 20 \cdot 10^6$  Osteosarkomzellen in die distale Markhöhle des Femurs. Eine Versuchsreihe wurde durch die tägliche Applikation von 10 mg/kg Körpergewicht Cyclosporin A erweitert bis der Tumor palpabel war. In jeweils 2 Serien wurde mit einer Zellzahl von  $10 \cdot 10^6$  ein Tumorwachstum von 75% bzw. 100% mit Cyclosporin A-Gabe erreicht bzw. von 50% und 67% ohne Cyclosporin A-Gabe. Erste palpable Anzeichen eines Tumorwachstums zeigten sich nach 28 Tagen. Lungenmetastasen traten in 100% der Fälle auf.

Auf dieser Arbeit aufbauend erfolgte ein Patent für F. Gouin 2006 (24), welches adaptiert unter anderem in Fragestellungen zu osteoblastischen Metastasen des Prostata-CA in der Arbeit von F. Lamoureux et al 2008 (37) Verwendung fand. Das Patent beschreibt die Applikation von  $4 - 10 \cdot 10^6$  Osteosarkomzellen in 200 µl 1,2% - 2% Alginatlösung sowohl mit Cyclosporin A-Gabe als auch und ohne in die Markhöhle von Femora von Sprague-Dawley Ratten über eine Arthrotomie, Trepanation mittels 14er Trocard gefolgt von Verschluss des knöchernen Zugangsweges mittels Fibrinkleber, Knochengewebe oder Calciumphosphat. Die Ergebnisse waren dieselben wie bei B. Cherrier et al 2005 (10). Das Ergebnis unter Einbezug aller Versuchsreihen lieferte Tumorwachstum in 78% der Fälle mit Lungenmetastasen in 96% der Fälle, wobei keine Empfehlung für oder gegen Cyclosporin A-Gabe ausgesprochen wurde.

Bei einem Besuch der Arbeitsgruppe 2008 zwecks Kooperation wurde uns eine weitere Veränderung der Vorgehensweise aus der Publikation von F. Gouin et al 2006 vorgestellt (23). Bei diesem „Modell Dekortizierung“ erfolgt der Hautschnitt am lateralen Femur distal des Trochanter major, Aufsuchen und Darstellen der Extensoren- und Flexorenloge mit Längsinzision intraseptal bis zum Femurknochen. Anschließend wurde lokal die Kortikalis mit einem Lühr auf einer Länge von 10 mm dekortiziert und dort das würfelförmige  $10 \text{ mm}^3$  Chondrosarkom als Allografttransplantat implantiert. Abschließend erfolgte das Abdecken der Implantationsstelle durch die Muskelschichten. Nach 7 bis 11 Tagen zeigte sich bei allen operierten Ratten Tumorwachstum.

Im Vergleich zu unseren Ergebnissen konnten wir dieses Tumorwachstum ohne die Applikation von Cyclosporin A nicht reproduzieren. Weder die von uns operierten Ratten mit den Osteosarkom-Zellen noch mit dem Chondrosarkom-Zellen zeigten über den beobachteten Zeitraum von bis zu 14 Wochen Hinweise für ein Tumorwachstum.

Dieses Modell der Einbringung eines Tumorwürfels als Allografttransplantat an dem seitlich dekortizierten Femur stellt sich in eine Reihe mit den Modellen der subcutanen oder intravenösen Applikation von Tumorzellen. Auch dieses Modell ermöglicht keine Simulation eines adäquaten, primär intramedullär gelegenen Knochensarkoms mit einem typischen Microenvironment und Wachstumsmuster. Es fehlt die Möglichkeit, Aussagen treffen zu können in Hinblick auf die Wechselwirkungen mit Zellmediatoren, der unterschiedlichen extrazellulären Matrix sowie dem Anflutverhalten von Medikamenten mit unterschiedlichen zu erwartenden Konzentrationen. Ebenso lässt sich keine verwertbare Aussage zur eingebrachten Tumorzellanzahl oder zum Metastasierungsmustern treffen. Vielmehr liefert es nur die Möglichkeit der Simulation einer großen betroffenen Weichteilkomponente.

Es folgte im Jahr 2011 eine Veränderung des „Modell Dekortizierung“ durch E. David et al (13). Hierbei wird ein Modell beschrieben, welches einen 5 mm weiten Zugangsweg intramuskulär an die Tibia wählt. Anschließend wurde die Implantation eines Tumorwürfels eines soliden Tumors von 2 mm Kantenlänge durchgeführt. Es folgten die Muskel- sowie Hautnaht. Auch hier zeigte sich bei allen Versuchstieren lokales Tumorwachstum. In dieser Arbeit wurde kein Hinweis auf die Anwendung eines Immunsuppressivums gegeben. Nachteile ergeben sich auch für dieses Modell durch die Lokalisation des Primärtumors.

Ein weiteres von uns auf Relevanz geprüftes „Modell Quadriceps“ verfolgte die Tumorzellenapplikation über einen Zugangsweg per Längsinzision 2 - 3mm cranial von der Patella auf der dorsalen Seite des Femur zwischen Musculus vastus medius und Musculus vastus intermedius, Greifen und Fixieren des Knochens unter Zuhilfenahme einer chirurgischen Splitterpinzette und Darstellen der dorsalen Knochenoberfläche. Anschließend wurde die senkrechte Punktion des Knochens mittels Stahlkanüle und Einführen einer Venenverweilkanüle in den Markraum mit Applikation von Tumorzellen angewendet. Dieser Zugangsweg spart eine Gelenkbeteiligung vollständig aus und verhindert somit eine Kontamination mit den Tumorzellen und sorgt aufgrund eines geringeren Traumas für eine schonendere Vorgehensweise für das Versuchstier. Diese Implantation und Aussparung des Gelenkes ermöglicht eine einfachere spätere Resektion des Tumors. Die Punktion stellt sich angesichts der festen Struktur der Kortikalis als beschwerlich heraus und erfordert die Verwendung eines Bohrers. Die Punktion muss gefühlvoll erfolgen um die ventrale Kortikalis nicht zu durchbohren, die Applikation von Tumorzellen mittels Kanüle erfolgt senkrecht zur

Markhöhle und geht wiederum mit einem höheren Kontaminationsrisiko im Verhältnis zur Arthrotomie einher.

Der Zugangsweg per Arthrotomie ist durch Kurth et al und die französische Arbeitsgruppe bereits für osteolytische Metastasen und das Osteosarkom etabliert. Dieses liefert den Vorteil der guten Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Wir haben diese Modelle auf Durchführbarkeit getestet und an unsere Bedürfnisse angepasst und erweitert. Um den Materialaufwand zu minimieren verwendeten wir weder elektrische Gerätschaften wie Bohrer oder Utensilien zur Durchführung einer Inhalationsnarkose noch teure Materialien wie Fibrinkleber oder Knochenwachs, sondern beschränkten uns auf Venenverweilkanülen und Tuberkulinspritzen mit Kanülen sowie sterile Materialien aus dem Krankenhausalltag. Der operative Zugangsweg ist minimalchirurgisch durchzuführen um Einschränkungen für das Tier und weitere Komplikationen zu minimieren. Fehlpunktionen, Perforationen des Femurs, Serombildung im Kniegelenk so wie Kontaminationen durch die Tumorzellen außerhalb der Markhöhle stellten dabei die am häufigsten von uns beobachteten Komplikationen dar. Aufgrund unserer Erfahrungen aus den Vorversuchen und der damit einhergehenden Optimierung der Vorgehensweise konnten wir diese genannten Komplikationen im weiteren Verlauf nicht beobachten. Gerade für eine spätere Resektion des Tumors, z.B. zur Simulation von Prothesenimplantationen, ist eine Kontamination des Kniegelenks unbedingt zu vermeiden. Um das Austreten der Tumorzellen aus der Markhöhle in das Kniegelenk durch die Schwerkraft zu verhindern, erzielten wir, wie im Vorversuch nachgewiesen, beste Ergebnisse durch die Abdichtung mittels Vaseline-Pfropfen. Hierbei zeigte sich die Applikation der Paraffin-Salbe mit Hilfe einer Stahlkanüle direkt in den Bohrkanal als einfacher handhabbar als die manuelle Abdichtung mittels Knochenwachs.

Bezüglich der Inokulation der Tumorzellen in das Femur gibt es bereits Erfahrungen mit zwei verschiedenen Applikationsformen. Bei der zuerst zu nennenden soliden Form wird Tumorzellmasse vom Menschen oder derselben Spezies wie das Versuchstier als Operationspräparat oder als Zucht an einem anderen Versuchstier gewonnen, als Stanzzylinder oder Quader präpariert und in die Markhöhle eingebracht oder nach Dekortizierung an das Periost des Femurs angelagert. Dieses simuliert einen pathophysiologisch und morphologisch echten Tumor. Die Arbeitsgruppe um Gouin et al erzielte mit dieser Vorgehensweise bei allen

operierten Tieren Tumorwachstum (23). Allerdings kann dieser aufgrund der Anwesenheit von Fremdeiweiß zu Abstoßungsreaktionen führen und ist hinsichtlich der anspruchsvollen Anzüchtung am lebendigen Organismus mit einem großen Aufwand verbunden und in seiner Verfügbarkeit eingeschränkt. Des Weiteren lässt sich keine exakte Aussage zur präzisen Zellanzahl treffen. Die zweite Applikationsform wird mit einer flüssigen Suspension aus Nährbouillon und Tumorzellen durchgeführt. Yu et al erzielte auf die Weise, abhängig von der gewählten Zellzahl von  $6 \cdot 10^5$  bis  $1 \cdot 10^6$ , ein Tumorwachstum von bis zu 100% innerhalb der Wochen nach der Inokulation (64). Vorteil ist neben der genau bestimmbaren Zellzahl in einem präzisen Volumen die Abwesenheit von Fremdeiweiß und die gute Verfügbarkeit durch Zucht in Nährmedien. Außerdem kann parallel zum In-vivo-Versuch die weitere In-vitro-Kultivierung erfolgen um eine Vitalität der Zellen aufzuzeigen. Aufgrund dessen handelt es sich jedoch auch nicht um einen soliden Tumor, und bei der Applikation kann es angesichts der hohen intramedullären Vaskularisierung zu Tumorembolien kommen, welche zum Tode des Versuchstieres führen.

Wir konnten die Ergebnisse von Yu et al, obgleich wir eine erhöhte Zellzahl von  $5 - 6 \cdot 10^6$  verwendeten, nicht reproduzieren und erzielten kein Tumorwachstum.

### **3) Modifikation mit Cyclosporin A**

Weder bei den mit Chondrosarkom-Zellen noch mit den Osteosarkom-Zellen operierten Ratten erzielten wir ein nachweisbares Tumorwachstum. Zur Fehleranalyse zogen wir fünf verschiedene mögliche Ursachen in Betracht, welche im Folgenden einzeln diskutiert werden.

Die Methodik der Implantation der Tumorzellen konnten wir als erste Fehlerursache ausschließen. Dies lag auf der einen Seite an den positiven Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die dieses Modell in veränderter Form bereits für Knochensarkome oder Knochenmetastasen durchgeführt hatten. So erzielte die Arbeitsgruppe um Cherrier in 80% der Fälle lokales Tumorwachstum mit dem Osteosarkom (10) sowie Yu et al bis zu 100% lokales Tumorwachstum mit der Osteosarkom-Zelllinie (64).

Als zweite Ursache zogen wir die mögliche Wahl von ungeeigneten Tumorzellen in Betracht. Sowohl die Chondrosarkomzellen als auch die Osteosarkomzellen wurden bereits in in-vivo erfolgreich verwendet. Die Chondrosarkomzellen stammten von einem Primärtumor von der

Arbeitsgruppe um F. Gouin aus Nantes, Frankreich, ab. Diese konnte bereits ohne Immunsuppressivum erfolgreich Tumorwachstum nachweisen, allerdings per „Modell Dekortizierung“ über den lateralen Zugangsweg und Einbringen eines 10 mm<sup>3</sup> Chondrosarkom Allografts an die Kortikalis des lateralen Femurs (23). Wie oben bereits angeführt liefert dieses Modell keine zu erwartende Veränderung zum Ansprechen der Transplantationsmöglichkeit der Tumorzellen, sondern eine eingeschränkte Interpretationsmöglichkeit der Ergebnisse und wurde daher nicht als Modell von uns verwendet. Eine weitere mögliche Ursache, kein Tumorwachstum erzielt zu haben, liegt in dem biologischen Verhalten der Tumorzellen begründet. Da die Chondrosarkom-Zellen einem Malignitätsgrad G II entsprechen, ist deren Wachstums- und Proliferationsrate gegebenenfalls zu gering und nicht aggressiv genug, um in dem Versuchstier in dem beobachteten Zeitraum zu Tumorwachstum zu führen oder das Immunsystem der Versuchstiere zu stark. Da wir mit eben dieser Zelllinien in einer ersten Versuchsreihe kein Wachstum nachweisen konnten, verwendeten wir daraufhin in einer zweiten Versuchsreihe zur Überprüfung der Methodik die Osteosarkom-Zelllinie (UMR 106-01), von welcher wir uns aufgrund ihres hochproliferativen und aggressiven Wachstums im Vergleich zum Chondrosarkom ein erfolgreicher lokales Tumorwachstum erhofften. Diese Zelllinie kam bereits in anderen Rattenmodellen zum Einsatz und zeigte, abhängig von der gewählten implantierten Zellzahl, ohne Hinweise auf das Verwenden einer Immunsuppression in bis zu 100% der Fälle nachweisbares lokales Tumorwachstum auf (18, 64). In unserem Modell erzielten wir mit dieser Zellreihe und ohne Immunsuppression kein Tumorwachstum.

Als dritte Ursache betrachteten wir die Vitalität der Tumorzellen der Osteosarkom- und Chondrosarkom-Zellen. Diese wurde präoperativ mikroskopisch auf Adhärenzen überprüft sowie mit Trypanblau angefärbt und als gut befunden. Parallel zur operativen Implantation der Tumorzellen wurde ein zweiter Teil der Zellen ausgesät und in-vitro weiterhin kultiviert. In dem Kontrollmedium konnten wir eine regelrechte Zellvitalität feststellen. Somit konnten wir diese dritte Ursache ebenso als mögliche Fehlerquelle ausschließen.

Insgesamt haben wir zwischen  $5 - 6 \cdot 10^5$  Tumorzellen appliziert. Die Anzahl der von uns Eingebachten Tumorzellen sowie die Zusammensetzung des Transportmediums wurden in gleicher Weise bereits in anderen Versuchsreihen untersucht und als optimale Parameter für ein sicheres Tumorwachstum ermittelt. Bereits ab einer Menge von  $8 \cdot 10^5$  UMR 106-Zellen zeigte andere In-vivo-Studien eine 100%ige Transplantationsrate (64).

Diese Überlegungen leiteten uns dazu davon auszugehen, dass das Immunsystem der Ratte der entscheidende Faktor ist, der eine Tumorbildung der orthotop implantierten Zellen verhindert. Andeutungen zu dieser Vermutung finden sich teilweise bereits zu Osteosarkom-Studien in der Literatur beschrieben. B. Cherrier erzielt Tumormwachstum von bis zu 100% bei Osteosarkom Zellen mit Cyclosporin A-Applikation, jedoch auch ein Tumormwachstum von bis zu 67% ohne die Applikation. Die anderen in der Literatur beschriebenen Tiermodelle mit positivem Tumormwachstum liefern keine Angaben zur Verwendung eines Immunsuppressivums.

Um unsere Überlegungen mit der Ergänzung des Immunsuppressivums zu belegen und die anderen möglichen Fehlerquellen als Ursachen auszuschließen veränderten wir unser Tiermodell und ergänzten es daraufhin um die perioperative Gabe von 30mg/kg Körpergewicht Cyclosporin A. Die erste Applikation erfolgte einen Tag präoperativ und anschließend über einen Zeitraum von 15 Tagen, jeweils als intramuskuläre Injektion. Sowohl die Dosierung also auch die Applikationsdauer stützt sich dabei auf Studien aus der aktuellen Literatur (2, 10, 14, 53). Um abschließend erfolgreich Tumormwachstum zu erzielen, beschränkten wir uns in der folgenden Versuchsreihe (Phase 3) zunächst auf die aggressiveren, hochproliferativen Osteosarkom-Zellen in Kombination mit Cyclosporin A und stellten, aufgrund des umfangreicheren Studiendesigns und der schwierigeren Anzucht, eine weitere Versuchsreihe mit den Chondrosarkom-Zellen vorerst zurück.

Wir erzielten mit den Osteosarkom-Zellen in 86,8% der Fälle ein Tumormwachstum nach durchschnittlich 11,5 Tagen.

Das erzielte Tumormwachstum stellte sich mit den typischen radiologischen und histologischen Eigenschaften der Knochensarkome beim Menschen dar. Außerdem präsentierten 100% der Ratten mit lokalem Tumormwachstum ebenso Lungenmetastasen. Nicht ausschließen können wir jedoch, dass diese hämatogene Metastasierung ein Produkt der Inokulation ist und aufgrund der ausgeprägten Vaskularisierung des Markraums Tumorzellen in den Körperkreislauf eingeschwemmt wurden. Da jedoch die Ratten jederzeit immer sowohl lokales Tumormwachstum als auch Lungenmetastasen präsentierten, sehen wir dies beides in einem direkten Zusammenhang.



Ähnlich wie im Vorversuch verstarben einige Ratten intraoperativ. Wir führen dieses nicht auf die Cyclosporin A-Applikation zurück, sondern sehen dieses am ehesten im Kontext mit einer akuten Lungenembolie während des Einbringens der Tumoremulsion in das Femur.

Ein Nachteil dieses Modells mit Cyclosporin A hinsichtlich weiterer geplanter Versuchsvorhaben liegt in der schnellen Wachstumsrate der Tumoren. Durchschnittlich am 11. Tag nach Operation sieht man erste klinische Zeichen eines Tumorwachstums und bereits am im Durchschnitt 26. Tag erfordert das Tumolvolumen eine Euthanasie des Versuchstiers. Eine in weiteren Versuchsvorhaben durch unsere Arbeitsgruppe geplante Dosisfindung der Bisphosphonate über 56 Tage respektive eine Ermittlung der Konzentrationen der Bisphosphonate im Gewebe und im Tumor über 84 Tage ist auf die Weise nicht realisierbar.

Eine unserer initialen Anforderungen an das Modell bezog sich auf die Minimierung der potenziellen Störgrößen. Dadurch sollte die Interpretation der Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sein. Dieses betrifft sowohl den Aspekt der Verwendung von genetisch nicht veränderten Ratten und von humanen Tumorzellen als auch immunkompetenter Ratten. Da wir letztendlich Tumorwachstum und ein Metastasierungsmuster nur unter der Verwendung von Immunsuppressiva erreichen konnten, muss das Ergebnis und die Übertragung auf den Menschen immer in diesem durch Immunsuppressiva beeinflussten Kontext interpretiert werden.

#### **4) Perspektiven**

Auf diese Weise konnten wir ein einfaches und verlässliches Tiermodell für Osteosarkomzellen in langen Röhrenknochen entwickeln. Unsere ursprüngliche Absicht, intramedullär im Femur ein Tumorwachstum durch eingeführte Chondrosarkomzellen zu bewirken, konnten wir nicht erreichen. Als Ursachen müssen die langsamere Zellteilungsrate, das langsamere und weniger aggressive Wachstum und auch das Immunsystem der Ratte in Betracht gezogen werden. Für weitere Forschungsschritte zur Etablierung des Modells auch für das Chondrosarkom sollte hierfür eine Immunsuppression mittels Cyclosporin A analog zum Osteosarkom-Modell in Erwägung gezogen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Modifikation des Protokolls betrifft die Applikationsform des Cyclosporin A im Sinne einer einmaligen, höheren Dosis als Single-Shot-Applikation. Durch

diese Änderung könnten evtl. die Versuchstiere bei ähnlich guten Anwachsrate des Tumors länger am Versuch teilhaben.

Die Wahl einer anderen Zelllinie stellt eine weitere Veränderungsmöglichkeit des Modells dar, um Chondrosarkomwachstum zu erzielen.

E. David verwendet die genidentische Swarm Rat Chondrosarcoma Zelllinie, ein gut differenziertes Chondrosarkom einer Ratte, welche er in Spenderratten anzüchtet, exzidiert und als soliden Tumor an die Tibia anlegt. So erzielt die Arbeitsgruppe unter Verzicht eines Immunsuppressivums bei allen operierten Ratten Tumorwachstum (13). Diese Vorgehensweise ist sehr aufwändig und verlangt eine größere Anzahl an Versuchstieren, da eine parallel zur Versuchsreihe mitlaufende Spenderratte, welche jeweils getötet wird und von der anschließend der vorhandene Tumor auf die anderen Versuchstiere transplantiert wird, geführt werden muss. Des Weiteren wird auf diese Weise kein intramedulläres Tumorwachstum erzielt. Ein ähnliches Vorgehen verwendete ebenso S. Kenan et al und erzielte ohne Immunsuppression bei 75% der Versuchstiere typisches Tumorwachstum, radiologisch nach 4 bis 6 Wochen nachweisbar, sowie bei 1 von 24 operierten Ratten Lungenmetastasen (32). Nachteil bei der Verwendung von genidentischen Zellen ist das Fehlen der genetischen Ausstattung und der Mutationen einer humanen Sarkomzelle. Ein weiterer Wechsel der Zelllinie würde die Wahl eines hochproliferativen, aggressiver wachsenden gering differenzierten Chondrosarkoms darstellen.

Die Wahl eines anderen Versuchstieres beschreibt eine weitere Möglichkeit, dieses hier erprobte Modell so zu verändern, um Tumorwachstum mit dem Chondrosarkom zu erzielen.

In der Tumorforschung werden häufig Xenotransplantationen auf athymische Mäuse durchgeführt. Aufgrund der fehlenden Entwicklung des Thymus und einem Mangel an reifen T-Lymphozyten erfolgt keine vom Immunsystem des Versuchstiers induzierte Abstoßungsreaktion (57).

In der Literatur finden sich zahlreiche solcher Modelle. Ein Modell zur Untersuchung von Metastasen des Osteosarkoms an athymischen Mäusen beschreibt Ö. Berlin (4). Hierbei wird eine humane Osteosarkom-Zelllinie orthotop intratibial transdiaphysär mit einer 27 Gauge Nadel athymischen Nacktmäusen implantiert. Nach 8 Wochen entwickeln alle Versuchstiere lokales Tumorwachstum sowie Lungenmetastasen. Die von uns verwendete Ratten-

Osteosarkom-Zelllinien UMR 106-01 fand zum ersten Mal 2001 in athymischen Mäusen Verwendung (20).

Ebenso wurden bereits mit anderen humanen Chondrosarkom-Zellreihen Xenotransplantationen an Nacktmäusen durchgeführt.

Die histologisch einem G II Chondrosarkomzellen entsprechenden Zellen OUMS-27 eines 65-jährigen Mannes wurden athymischen Mäusen subkutan injiziert und zeigten in 100% der Fälle Tumorwachstum (34). Die Zellen wachsen sehr langsam und erfordern ein über einen langen Zeitraum angelegtes Studiendesign.

D. Monderer et al versuchten aus zehn gewonnenen humanen Chondrosarkom-Biopsien aus unterschiedlichen Tumoren neue Zelllinien in athymischen Mäusen durch subkutane Injektion zu etablieren. Lediglich ein high-grade Chondrosarkom konnte in-vivo erfolgreich angezüchtet werden (45). Dieses verdeutlicht die schwierigen Umstände, selbst in immuninkompetenten Versuchstieren erfolgreich humane Chondrosarkomzellen anzuzüchten.

Humane Zelllinien sind unabdingbar um neben der genotypischen und phänotypischen Darstellung auch den klinischen Verlauf abzubilden. Diese Modelle mit Xenotransplantation sind enorm aufwändig und eignen sich zur Untersuchung von lokalen Interaktionen, bilden jedoch keinen richtigen Primärtumor ab. Ebenso könnten auch Folgeoperationen mit orthopädischen Fragestellungen, wie von unserer Arbeitsgruppe angestrebt, aufgrund der Größe der Versuchstiere nicht realisiert werden. Insbesondere bietet die Anatomie der Ratte seitens operativer Verfahren, wie z.B. Prothesenimplantation oder Tumorresektion, erhebliche Vorteile gegenüber einem Mausmodell.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass viele Einzelaspekte die Erarbeitung eines optimalen Tiermodells für unsere Forschungsvorhaben beeinflussen. Die Herkunft der Zelllinien und ihre Artzugehörigkeit, die allogene oder xenogene Transplantation, die Art der Transplantation in Form eines soliden Tumors oder einer Zellsuspension, die örtliche Übereinstimmung der Transplantation, das lokale und systemische Verhalten der Tumorzellen mit typischen Tumorzeichen und sowohl das Metastasierungs- als auch das histologische Muster sind zielgerichtet zu erarbeiten und im optimierten Tiermodell zu verankern.

Dieses von uns entwickelte Modell enthält einige optimierte Teilaspekte und bietet viele Chancen. Es ist einfach und mit wenig materiellem Aufwand zu realisieren und liefert reproduzierbar identisches Tumorwachstum, welches die typischen Eigenschaften von primären Knochensarkomen am Menschen nachahmt. Es ermöglicht nicht nur das Studieren der pathophysiologischen Verhaltensweisen am Knochen oder Metastasierungsmuster, sondern auch die Entwicklung neuer Therapieansätze. Unser Hauptaugenmerk liegt, bei weiteren auf dieser Arbeit aufbauenden Versuchsvorhaben, auf dem Einsatz von Bisphosphonaten. Insbesondere soll der Einfluss von Applikationsintervallen und damit verbunden die Konzentration der Bisphosphonate im Tumorgewebe sowie in Organsystemen, um eine wirksame Therapie für Knochensarkompatienten zu entwickeln, soll mit Hilfe des entwickelten Tiermodells studiert werden.

Dieses Modell kann auch im Hinblick auf weitere Fragestellungen in der Tumororthopädie herangezogen werden. Ebenso kann auf das reproduzierbare Tumorwachstum der primären Knochensarkome in langen Röhrenknochen bei weiteren durch unsere Arbeitsgruppe geplanten Versuchsvorhaben aufgebaut werden. Insbesondere erhoffen wir uns neue Aufschlüsse für Fragen der Tumorresektionen oder Tumorprothesenimplantationen.

## 6 Zusammenfassung

Osteosarkome und Chondrosarkome stellen die häufigsten primären Knochensarkome dar. Für das Chondrosarkom gibt es neben der weiten Tumorresektion keine befriedigenden adjuvanten therapeutischen Optionen. Beim Osteosarkom bedarf es speziell für palliative Situationen neue therapeutische Ansätze, um eine hohe Lebensqualität für die Patienten zu ermöglichen.

Die positive Erfahrung mit Bisphosphonaten bei anderen Tumoren weckt das große Interesse und die Hoffnung für neue Therapieansätze auch bei Knochensarkomen um die Prognose der Patienten zu verbessern.

Um die komplexen Interaktionen von Tumor und möglicher Therapieansätze weitergehend zu untersuchen ist ein In-vivo-Rattenmodell unabdingbar.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Rattenmodell ist es gelungen, reproduzierbar, unter definierten Bedingungen, unsere Ansprüche erfüllend, orthotop in Ratten Osteosarkomzellen anzuzüchten, welche die typischen Eigenschaften von primären Knochensarkomen am Menschen nachahmt. Dies erreichten wir jedoch nur unter Verwendung eines Immunsuppressivums..

Für das Chondrosarkom konnten wir kein lokales Tumorwachstum nachweisen. Um dafür zukünftige Erfolge zu erzielen, ist eine weitere Anpassung dieses Modells erforderlich.

Dieses Modell ermöglicht nicht nur das Studieren der pathophysiologischen Verhaltensweisen am Knochen oder Metastasierungsmuster, sondern auch die Entwicklung neuer Therapieansätze, z. B. mit Bisphosphonaten.

Dieses Modell kann auch im Hinblick auf weitere Fragestellungen in der Tumororthopädie herangezogen werden. Gleichmaßen kann bei weiteren durch unsere Arbeitsgruppe geplanten Versuchsvorhaben auf das reproduzierbare Tumorwachstum der primären Knochensarkome in langen Röhrenknochen aufgebaut werden. Insbesondere erhoffen wir uns neue Aufschlüsse für Fragen der Tumorresektionen oder Tumorprothesenimplantationen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aapro M, Abrahamsson PA, Body JJ, Coleman RE, Colomer R, Costa L, et al. Guidance on the use of bisphosphonates in solid tumours: Recommendations of an international expert panel. *Ann Oncol.* 2008 Mar;19(3):420-32.
2. Akhter J, Yao P, Johnson LA, Riordan SM, Morris DL. A new peritoneal carcinomatosis model in cyclosporine immunosuppressed rats. *Anticancer Res.* 2008 Jan-Feb;28(1A):105-8.
3. Berenson JR, Lipton A. Bisphosphonates in the treatment of malignant bone disease. *Annu Rev Med.* 1999;50:237-48.
4. Berlin O, Samid D, Donthineni-Rao R, Akeson W, Amiel D, Woods VL, Jr. Development of a novel spontaneous metastasis model of human osteosarcoma transplanted orthotopically into bone of athymic mice. *Cancer Res.* 1993 Oct 15;53(20):4890-5.
5. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: An analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol.* 2002 Feb 1;20(3):776-90.
6. Blouin S, Basle MF, Chappard D. Rat models of bone metastases. *Clin Exp Metastasis.* 2005;22(8):605-14.
7. International randomised controlled trial for the treatment of newly diagnosed ewing's sarcoma family of tumours (ESFT), euro ewing 2012 [Internet].; 2014. Available from: <http://controlled-trials.com/ISRCTN92192408>.
8. Brown JE, Neville-Webbe H, Coleman RE. The role of bisphosphonates in breast and prostate cancers. *Endocr Relat Cancer.* 2004 Jun;11(2):207-24.
9. Campbell JP, Merkel AR, Masood-Campbell SK, Eleftheriou F, Sterling JA. Models of bone metastasis. *J Vis Exp.* 2012 Sep 4;(67):e4260. doi(67):e4260.
10. Cherrier B, Gouin F, Heymann MF, Thiery JP, Redini F, Heymann D, et al. A new experimental rat model of osteosarcoma established by intrafemoral tumor cell inoculation, useful for biology and therapy investigations. *Tumour Biol.* 2005 May-Jun;26(3):121-30.
11. Coleman RE. Efficacy of zoledronic acid and pamidronate in breast cancer patients: A comparative analysis of randomized phase III trials. *Am J Clin Oncol.* 2002 Dec;25(6 Suppl 1):S25-31.
12. Costa L, Major PP. Effect of bisphosphonates on pain and quality of life in patients with bone metastases. *Nat Clin Pract Oncol.* 2009 Mar;6(3):163-74.

13. David E, Guihard P, Brounais B, Riet A, Charrier C, Battaglia S, et al. Direct anti-cancer effect of oncostatin M on chondrosarcoma. *Int J Cancer*. 2011 Apr 15;128(8):1822-35.
14. del Cerro M, Seigel GM, Lazar E, Grover D, del Cerro C, Brooks DH, et al. Transplantation of Y79 cells into rat eyes: An in vivo model of human retinoblastomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993 Nov;34(12):3336-46.
15. Dickey ID, Rose PS, Fuchs B, Wold LE, Okuno SH, Sim FH, et al. Dedifferentiated chondrosarcoma: The role of chemotherapy with updated outcomes. *J Bone Joint Surg Am*. 2004 Nov;86-A(11):2412-8.
16. Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. *Cancer*. 1995 Jan 1;75(1 Suppl):203-10.
17. Ek ET, Dass CR, Contreras KG, Choong PF. Inhibition of orthotopic osteosarcoma growth and metastasis by multitargeted antitumor activities of pigment epithelium-derived factor. *Clin Exp Metastasis*. 2007;24(2):93-106.
18. Ek ET, Dass CR, Contreras KG, Choong PF. Pigment epithelium-derived factor overexpression inhibits orthotopic osteosarcoma growth, angiogenesis and metastasis. *Cancer Gene Ther*. 2007 Jul;14(7):616-26.
19. Fiorenza F, Abudu A, Grimer RJ, Carter SR, Tillman RM, Ayoub K, et al. Risk factors for survival and local control in chondrosarcoma of bone. *J Bone Joint Surg Br*. 2002 Jan;84(1):93-9.
20. Fisher JL, Mackie PS, Howard ML, Zhou H, Choong PF. The expression of the urokinase plasminogen activator system in metastatic murine osteosarcoma: An in vivo mouse model. *Clin Cancer Res*. 2001 Jun;7(6):1654-60.
21. Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *Endocr Rev*. 1998 Feb;19(1):80-100.
22. Forrest SM, Ng KW, Findlay DM, Michelangeli VP, Livesey SA, Partridge NC, et al. Characterization of an osteoblast-like clonal cell line which responds to both parathyroid hormone and calcitonin. *Calcif Tissue Int*. 1985 Jan;37(1):51-6.
23. Gouin F, Ory B, Redini F, Heymann D. Zoledronic acid slows down rat primary chondrosarcoma development, recurrent tumor progression after intralesional curettage and increases overall survival. *Int J Cancer*. 2006 Sep 1;119(5):980-4.
24. Gouin F, Redini F, Heymann D, inventors; Procedure for producing an animal osteosarcoma model that mimics human pathology uses tumour cells with high osteogenesis capacity introduced intra-osseously into host animal. FR 2006-03-31 .
25. Grimaud E, Damiens C, Rousselle AV, Passuti N, Heymann D, Gouin F. Bone remodelling and tumour grade modifications induced by interactions between bone and swarm rat chondrosarcoma. *Histol Histopathol*. 2002 Oct;17(4):1103-11.

26. Grimer RJ, Gosheger G, Taminiau A, Biau D, Matejovsky Z, Kollender Y, et al. Dedifferentiated chondrosarcoma: Prognostic factors and outcome from a european group. *Eur J Cancer*. 2007 Sep;43(14):2060-5.
27. Guerne PA, Lotz M. Interleukin-6 and transforming growth factor-beta synergistically stimulate chondrosarcoma cell proliferation. *J Cell Physiol*. 1991 Oct;149(1):117-24.
28. Hogendoorn P, Bovee J, Nielsen G. Chondrosarcoma (grades I-III), including primary and secondary variants and periosteal chondrosarcoma. in: World health organization classification of tumours of soft tissue and bone. 4th ed. Fletcher C, Bridge J, Hogendoorn P, Mertens F, editors. Lyon: Vol 5, p.264; 2013.
29. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res*. 1995 Oct;10(10):1478-87.
30. Inwards CY, Unni KK. Classification and grading of bone sarcomas. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1995 Jun;9(3):545-69.
31. Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami-H A, Croucher PI. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: Evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer*. 2001 Apr 20;84(8):1126-34.
32. Kenan S, Steiner GC. Experimental transplantation of the swarm rat chondrosarcoma into bone: Radiological and pathological studies. *J Orthop Res*. 1991 May;9(3):445-51.
33. Kubo T, Shimose S, Matsuo T, Tanaka K, Yasunaga Y, Sakai A, et al. Inhibitory effects of a new bisphosphonate, minodronate, on proliferation and invasion of a variety of malignant bone tumor cells. *J Orthop Res*. 2006 Jun;24(6):1138-44.
34. Kunisada T, Miyazaki M, Mihara K, Gao C, Kawai A, Inoue H, et al. A new human chondrosarcoma cell line (OUMS-27) that maintains chondrocytic differentiation. *Int J Cancer*. 1998 Sep 11;77(6):854-9.
35. Kurth AH, Wang C, Hayes WC, Shea M. The evaluation of a rat model for the analysis of densitometric and biomechanical properties of tumor-induced osteolysis. *J Orthop Res*. 2001 Mar;19(2):200-5.
36. Lai TJ, Hsu SF, Li TM, Hsu HC, Lin JG, Hsu CJ, et al. Alendronate inhibits cell invasion and MMP-2 secretion in human chondrosarcoma cell line. *Acta Pharmacol Sin*. 2007 Aug;28(8):1231-5.
37. Lamoureux F, Ory B, Battaglia S, Pilet P, Heymann MF, Gouin F, et al. Relevance of a new rat model of osteoblastic metastases from prostate carcinoma for preclinical studies using zoledronic acid. *Int J Cancer*. 2008 Feb 15;122(4):751-60.
38. Leal CA, Shea M, Patterson JD, Hayes WC. Alendronate prevents strength loss from osseous metastatic defects in a rat model. Orlando. ; 1995.



39. Lee FY, Mankin HJ, Fondren G, Gebhardt MC, Springfield DS, Rosenberg AE, et al. Chondrosarcoma of bone: An assessment of outcome. *J Bone Joint Surg Am*. 1999 Mar;81(3):326-38.
40. Machado AP, Costa Rosa LF, Seelaender MC. Adipose tissue in walker 256 tumour-induced cachexia: Possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration. *Cell Tissue Res*. 2004 Dec;318(3):503-14.
41. Martin TJ, Ingleton PM, Underwood JC, Michelangeli VP, Hunt NH, Melick RA. Parathyroid hormone-responsive adenylate cyclase in induced transplantable osteogenic rat sarcoma. *Nature*. 1976 Apr 1;260(5550):436-8.
42. Meyers PA, Healey JH, Chou AJ, Wexler LH, Merola PR, Morris CD, et al. Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Cancer*. 2011 Apr 15;117(8):1736-44.
43. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the surveillance, epidemiology, and end results program. *Cancer*. 2009 Apr 1;115(7):1531-43.
44. Mirra J, Picci P, Gold R. . In: *Bone tumours: Clinical, radiologic, and pathologic correlations*. Philadelphia: Lea and Febiger; 1989. p. 476-535.
45. Monderer D, Luseau A, Bellec A, David E, Ponsolle S, Saiagh S, et al. New chondrosarcoma cell lines and mouse models to study the link between chondrogenesis and chemoresistance. *Lab Invest*. 2013 Oct;93(10):1100-14.
46. Morioka H, Weissbach L, Vogel T, Nielsen GP, Faircloth GT, Shao L, et al. Antiangiogenesis treatment combined with chemotherapy produces chondrosarcoma necrosis. *Clin Cancer Res*. 2003 Mar;9(3):1211-7.
47. Quan GM, Ojaimi J, Li Y, Kartsogiannis V, Zhou H, Choong PF. Localization of pigment epithelium-derived factor in growing mouse bone. *Calcif Tissue Int*. 2005 Feb;76(2):146-53.
48. Rosen L, Harland SJ, Oosterlinck W. Broad clinical activity of zoledronic acid in osteolytic to osteoblastic bone lesions in patients with a broad range of solid tumors. *Am J Clin Oncol*. 2002 Dec;25(6 Suppl 1):S19-24.
49. Rosol TJ, Tannehill-Gregg SH, LeRoy BE, Mandl S, Contag CH. Animal models of bone metastasis. *Cancer*. 2003 Feb 1;97(3 Suppl):748-57.
50. Rozeman LB, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC. Pathology of primary malignant bone and cartilage tumours. *Int Orthop*. 2006 Dec;30(6):437-44.
51. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest*. 1991 Dec;88(6):2095-105.

52. Schrage YM, Machado I, Meijer D, Briaire-de Bruijn I, van den Akker BE, Taminiau AH, et al. COX-2 expression in chondrosarcoma: A role for celecoxib treatment? *Eur J Cancer*. 2010 Feb;46(3):616-24.
53. Shimizu T, Martin MS, Pelletier H, Lagadec P, Martin F. Effects of cyclosporin A on progressive and regressive tumors induced by two cancer lines derived from a single colon carcinoma chemically induced in the rat. *Immunobiology*. 1989 Feb;178(4-5):401-15.
54. Sissons HA. The WHO classification of bone tumors. *Recent Results Cancer Res*. 1976;(54)(54):104-8.
55. Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, Boos J, Winkelmann W, van Valen F. The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of ewing's sarcoma cell growth in vitro. *Anticancer Drugs*. 2003 Oct;14(9):767-71.
56. Sonnemann J, Eckervogt V, Truckenbrod B, Boos J, Winkelmann W, van Valen F. The bisphosphonate pamidronate is a potent inhibitor of human osteosarcoma cell growth in vitro. *Anticancer Drugs*. 2001 Jun;12(5):459-65.
57. Sprent J. Migration and lifespan of circulating B-lymphocytes of nude (nu/nu) mice. In: *Proc. First Intern. Workshop Nude Mice*. New York, Stuttgart: G. Fischer Verlag; 1974. p. 11-2.
58. Streitbuerger A, Harges J, Gosheger G. Section VII: Chondrosarcoma of bone: Diagnosis and therapy. In: Heymann D, editor. *Bone Cancer: Progression and Therapeutic Approaches*. First edition ed. Amsterdam: Academic Press; 2010. p. 407-16.
59. Streitbuerger A, Harges J, Gebert C, Ahrens H, Winkelmann W, Gosheger G. Cartilage tumours of the bone. diagnosis and therapy. *Orthopade*. 2006 Aug;35(8):871,81; quiz 882.
60. Streitbuerger A, Henrichs M, Ahrens H, Lanvers-Kaminzky C, Gouin F, Gosheger G, et al. Cytotoxic effect of clodronate and zoledronate on the chondrosarcoma cell lines HTB-94 and CAL-78. *Int Orthop*. 2011 Sep;35(9):1369-73.
61. Streitburger A, Ahrens H, Balke M, Buerger H, Winkelmann W, Gosheger G, et al. Grade I chondrosarcoma of bone: The munster experience. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Apr;135(4):543-50.
62. Sutton KM, Wright M, Fondren G, Towle CA, Mankin HJ. Cyclooxygenase-2 expression in chondrosarcoma. *Oncology*. 2004;66(4):275-80.
63. Utvag SE, Korsnes L, Rindal DB, Reikeras O. Influence of flexible nailing in the later phase of fracture healing: Strength and mineralization in rat femora. *J Orthop Sci*. 2001;6(6):576-84.
64. Yu Z, Sun H, Fan Q, Long H, Yang T, Ma B. Establishment of reproducible osteosarcoma rat model using orthotopic implantation technique. *Oncol Rep*. 2009 May;21(5):1175-80.

## 8 Danksagung

Bei Priv.-Doz. Dr. Arne Streitbürger möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die Anregung des interessanten Themas und seine begleitende hervorragende und tatkräftige Unterstützung sowie konstruktive Beratung in allen Belangen.

Klinikdirektor Professor Dr. Georg Gosheger danke ich für die Ermöglichung dieses aufwendigen Projekts in der Klinik für Allgemeine Orthopädie und Tumororthopädie.

Gleichermaßen möchte ich mich herzlich bei Dr. Helmut Ahrens für die vielseitige Unterstützung, für sein Engagement und seinen unermüdlichen Einsatz bedanken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern Julia und Dieter Haueis.

## **9 Lebenslauf**

## **10 Anhang**



**Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung (ZTE)**

der Medizinischen Fakultät

LEITER: DR. MED. VET. M. LÜCKE

---

## Teilnahmebescheinigung

**Herr Malte Haueis, geb. 28.03.1985, cand.med.**

hat im Sommersemester 2008 in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster an einem 18-stündigen

### **Kursus der Versuchstierkunde**

teilgenommen.

Es wurden theoretische und praktische Kenntnisse vermittelt, insbesondere

- rechtliche Bestimmungen für die Durchführung von Tierversuchen
- Maus, Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen als Versuchstier: Zucht, Haltung, Handling; biologische Daten, anatomische und physiologische Besonderheiten; klinische Beurteilung des Gesundheitszustandes; Applikationstechniken (i.v., i.m., i.p., s.c., oral); Blutentnahme
- Anästhesie: Methoden der Lokal- und Allgemeinanästhesie; Narkosestadien, Überprüfung der Narkosetiefe; Vorbereitung, Einleitung, Unterhaltung und Ausleitung der Narkose; postoperative Versorgung, Schmerzerkennung und -behandlung
- Versuchstierkennzeichnung
- tierschutzgerechte Tötung und Sektion von Versuchstieren
- Bewertung der Belastung von Versuchstieren im Tierexperiment
- Ergänzungs- und Ersatzmethoden zum Tierversuch

Münster, 27. Mai 2008

---

( Dr. med. vet. M. Lücke )  
Fachtierarzt für Versuchstierkunde

Landesamt für Natur,  
Umwelt und Verbraucherschutz  
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn  
Dr. med. Arne Streitbürger  
Klinik und Poliklinik für  
Allgemeine Orthopädie  
Universitätsklinikum Münster  
Albert-Schweitzer-Str. 33  
48129 Münster

Auskunft erteilt:  
Herr Skoff  
Direktwahl 02361/305-3478  
Fax 02361/305-3439  
poststelle@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen 8.87-  
50.10.36.08.100  
bei Antwort bitte angeben  
Ihre Nachricht vom:  
Ihr Aktenzeichen:

Tierschutz  
Durchführung von Tierversuchen; Genehmigung gem. § 8 Tierschutzgesetz  
Ihr Antrag vom 08.01.2008

Datum: 14.05.2008

Sehr geehrter Herr Dr. Streitbürger,

Hauptsitz:  
Leibnizstraße 10  
45659 Recklinghausen  
Telefon 02361 305-0  
Fax 02361 305-3215  
poststelle@lanuv.nrw.de  
www.lanuv.nrw.de

auf Grund des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Bekanntmachung der Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206) erteile ich Ihnen unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Tierversuches

Dienstgebäude:  
Hauptsitz Recklinghausen

**„In-vivo Konzentrationsbestimmung von verschiedenen Bisphosphonaten (Clodronat und Zoledronat) in unterschiedlichen Geweben (Tumor / Knochen / Serum) der Versuchstiere nach iatrogen induziertem Tumorstadium (Chondrosarkom / Osteosarkom / Karzinom)“**

Öffentliche Verkehrsmittel:  
Ab Recklinghausen Hbf mit  
Buslinie 236 bis Haltestelle  
"Siemensstraße" oder mit Buslinie  
235 bis Haltestelle "Blitzkuhlenstraße" und 10 Min. Fußweg  
in Richtung Trabrennbahn bis  
Siemensstraße

Ihrem Genehmigungsantrag entsprechend obliegt die Verantwortung für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens folgenden Personen:

**Verantwortlicher Leiter: Herr Prof. Dr. Georg Gosheger**  
**Stellvertretende Leiter: Herr Dr. med. Arne Streitbürger**

Diese Genehmigung ist für die Dauer von 36 Monaten ab dem 14.05.2008 befristet bis zum

**31.05.2011.**

Die Genehmigung wird unter den folgenden Bedingungen erteilt und mit folgenden Auflagen verbunden:

Bankverbindung:  
Landeskasse Düsseldorf  
Konto-Nr.: 41 000 12  
West LB AG  
(BLZ 300 500 00)  
BIC-Code: WELADED  
IBAN-Code: DE 41 3005  
0000 0004 1000 12

1.

Für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens darf folgende Tierart in folgender Anzahl verwendet werden:

**184 Ratten**

2.

Die Versuche werden in den Räumen des ZTE durchgeführt.

Es ist ein Tierbestandsbuch zu führen. Sie haben über die Herkunft und den Verbleib der Tiere Aufzeichnungen zu machen und diese drei Jahre lang aufzubewahren.

3.

An der Durchführung des Tierversuchsvorhabens dürfen neben dem Leiter und dem Stellvertreter des Versuchsvorhabens folgende Personen beteiligt werden:

**Herr Dr. med. vet. Gregor Hauschild**

**Herr Dr. med. Jendrik Harges**

**Herr Dr. med. Helmut Ahrens**

Die bezeichneten Personen dürfen ausschließlich die im Genehmigungsantrag aufgeführten Eingriffe oder Behandlungen im Rahmen der zulässigen Verantwortlichkeitsstufe durchführen.

4.

- a) Für die Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes sowie der hier erteilten Auflagen ist der/die in dieser Genehmigung bezeichnete Leiter/in des Tierversuchsvorhabens oder der/die in dieser Genehmigung bezeichnete Vertreter/in verantwortlich (§ 9 Abs. 3 TierSchG).
- b) Jeder beabsichtigte Wechsel der Versuchsleiter- oder Stellvertreterposition ist dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW unverzüglich anzuzeigen (§ 8 Abs. 4 Satz 2 TierSchG).

5.

- a) Diese Genehmigung gilt nur für die Art, Durchführung und Dauer der Eingriffe oder Behandlungen im Umfang des von Ihnen schriftlich beantragten Tierversuchsvorhabens.
- b) Änderungen genehmigter Versuchsvorhaben sind dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW anzuzeigen (§ 8a Abs. 7 Satz 2 TierSchG).



6.

- a) Der Widerruf dieser Genehmigung kann erfolgen, wenn gegen eine der Bedingungen oder eine der Auflagen dieser Genehmigung verstoßen wird.
- b) Die Durchführung des Tierversuchsvorhabens wird gemäß § 8a Abs. 5 TierSchG untersagt, wenn Tierversuche entgegen tierschutzrechtlicher Bestimmungen durchgeführt werden oder wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer gesetzten Frist abgeholfen wird.

7.

Natürliche und juristische Personen und nicht rechtsfähige Personenvereinigungen haben der zuständigen Behörde auf Verlangen die Auskünfte zu erteilen, die zur Durchführung der der Behörde durch das Tierschutzgesetz übertragenen Aufgaben erforderlich sind, § 16 Abs. 2 TierSchG. Der Inhaber dieser Genehmigung ist auskunftspflichtig nach § 16 Abs. 3 Satz 2 TierSchG und hat die mit der Überwachung beauftragten Personen zu unterstützen.

8.

Die Kennzeichnungen der Käfige oder Einrichtungen, in denen Versuchstiere gehalten werden, sind mit dem zuständigen beamteten Tierarzt abzustimmen.

9.

Ist ein Transport der Versuchstiere zwischen Operations- und Tierhaltungsraum unvermeidbar, so ist dafür Sorge zu tragen, dass mit Hilfe geeigneter Behältnisse dieser Transport so durchgeführt wird, dass negative Beeinflussungen durch äußere Einflüsse (z. B. Witterung, Lärm etc.) ausgeschlossen sind. Es ist insbesondere darauf zu achten, dass die Tiere keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind.

**Rechtsbehelfsbelehrung:**

Gegen diesen Bescheid kann nunmehr innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist schriftlich bei mir, dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW, Leibnizstraße 10, 45659 Recklinghausen, einzulegen oder dort zur Niederschrift zu erklären. Falls die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden sollte, würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

**Hinweise:**

1.

Diese Genehmigung ist zeitlich bis zum dem o. g. Termin befristet.

Hierzu werden folgende Hinweise gegeben:

- a) Vor Ablauf der Genehmigungsfrist ist ggf. der Abschluss des Tierversuchsvorhabens mitzuteilen.
- b) Sollte das Tierversuchsvorhaben innerhalb des zeitlichen Genehmigungsrahmens noch nicht abgeschlossen sein, ist rechtzeitig vor Ende der Genehmigungsfrist – über den zuständigen Tierschutzbeauftragten – ein Antrag auf Verlängerung des Tierversuchsvorhabens zu stellen.
- c) Sollte die Absicht bestehen, nach Abschluss dieses Versuches einen gleichen oder ähnlichen Versuch durchzuführen, weise ich schon jetzt darauf hin, dass mit den erneuten Antragsunterlagen gleichzeitig ein zusammenfassender Ergebnisbericht über das jetzt genehmigte Versuchsvorhaben vorzulegen ist.

2.

Auf die Einhaltung der allgemeinen Vorschriften des Tierschutzgesetzes in Bezug auf die Haltung, Betreuung, Ernährung und Pflege der Versuchstiere (§ 2 TierSchG) sowie der Vorschriften für die Durchführung von Tierversuchsvorhaben (§§ 9 und 9a TierSchG) i. V. m. den Straf- und Bußgeldvorschriften der §§ 17 bis 20 TierSchG wird hingewiesen.

3.

Evtl. erforderliche Ausnahmegenehmigungen nach dem Tierschutzgesetz (§ 9 Abs. 1 und Abs. 2 Nr. 7) oder anderen gesetzlichen Bestimmungen bleiben von dieser Genehmigung unberührt.

4.

Wer Tierversuche nach § 7 Abs. 1 TierSchG an Wirbeltieren durchführt, ist nach der Verordnung über die Meldung zu Versuchszwecken oder zu bestimmten anderen Zwecken verwendeter Wirbeltiere vom 4. November 1999 (BGBl. I S. 2156) - Versuchstiermeldeverordnung – verpflichtet, der zuständigen Behörde für jedes Kalenderjahr bis zum 31. März des folgenden Jahres Meldungen nach dem Muster der Anlage zur Versuchstiermeldeverordnung zu erstatten. Zuständige Behörde nach § 1 der Verordnung über Zuständigkeiten auf dem Gebiet des Tierschutzrechts (GV. NW. S. 508) ist hier die Kreisordnungsbehörde.

Dieser Bescheid ist nicht gebührenpflichtig.

Landesamt für Natur,  
Umwelt und Verbraucherschutz  
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn  
Dr. med. Arne Streitbürger  
Klinik und Poliklinik für  
Allgemeine Orthopädie  
Universitätsklinikum Münster  
Albert-Schweitzer-Straße 33  
48129 Münster

Auskunft erteilt:  
Herr Skoff  
Direktwahl 02361/305-3478  
Fax 02361/305-3439  
FB87-TSchutz@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen  
8.87-50.10.36.08.100  
bei Antwort bitte, angeben  
Ihre Nachricht vom:  
Ihr Aktenzeichen:

Datum: 08.12.2010

**Tierschutz;**

Genehmigung zur Verwendung von Wirbeltieren  
Ihr Antrag vom 18.11.2010

**„In-vivo Konzentrationsbestimmung von verschiedenen  
Bisphosphonaten (Clodronat und Zoledronat) in unterschiedlichen  
Gewebe (Tumor / Knochen / Serum) der Versuchstiere nach iatrogen  
induziertem Tumorwachstum (Chondrosarkom / Osteosarkom /  
Karzinom)“**

Hauptsitz:  
Leibnizstraße 10  
45659 Recklinghausen  
Telefon 02361 305-0  
Fax 02361 305-3215  
poststelle@lanuv.nrw.de  
www.lanuv.nrw.de

Sehr geehrter Herr Dr. Streitbürger,

antragsgemäß genehmige ich die von Ihnen beschriebene Änderung im o. g.  
Versuchsvorhaben.

Die Tierzahl ändert sich dadurch nicht.

Ich verlängere das Vorhaben um ein Jahr bis zum 31.05.2012.

Dieses Schreiben ist Bestandteil meiner Genehmigungsverfügung vom  
14.05.2008.

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag

*Dr. Hieronymus*  
(Dr. Dagmar Hieronymus)

Dienstgebäude:  
Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:  
Ab Recklinghausen Hbf mit  
Buslinie 236 bis Haltestelle  
"Siemensstraße" oder mit  
Buslinie 235 bis Haltestelle  
"Blitzkuhlenstraße" und 10 Min.  
Fußweg in Richtung Trabrenn-  
bahn bis Siemensstraße

Bankverbindung:  
Landeskasse Düsseldorf  
Konto-Nr.: 41 000 12  
West LB AG  
(BLZ 300 500 00)  
BIC-Code: WELADED  
IBAN-Code: DE 41 3005  
0000 0004 1000 12