

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie  
des Universitätsklinikums Halle (Saale)  
Direktor: Professor Dr. med. D. Vordermark

# **Osteopontin als Plasmamarker der Tumorhypoxie bei Patienten mit malignen Gliomen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Peter Martin Cuno, geb. Schmidt

geboren am 12.08.1985

in Berlin

Gutachter/Gutachterin:      1. Prof. Dr. D. Vordermark  
                                         2. Prof. Dr. Ch. Strauß  
                                         3. Prof. Dr. C. Petersen (Hamburg)

09.04.2013

09.12.2013

## Referat

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation von Osteopontin als Plasmamarker für hypoxisches Gewebe in malignen Gliomen.

Dazu wurden von den eingeschlossenen Patienten präoperativ, vor Beginn und nach Ende der Bestrahlung und zur ersten Nachsorgeuntersuchung insgesamt 4 Plasmaproben gewonnen, in denen die OPN-Konzentration mittels ELISA bestimmt wurde. Als Surrogatparameter für die Tumorphoxie wurde das Volumen der zentralen Tumornekrose in präoperativen MRT- und CT-Aufnahmen vermessen, außerdem auch das Gesamtvolumen des Tumors. Die Patienten wurden nachverfolgt und die Überlebenszeit ermittelt.

Es zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der OPN-Konzentration von Abnahmezeitpunkt zu Abnahmezeitpunkt. Für das Nekrosevolumen und das Tumolvolumen, aber am besten für das relative Nekrosevolumen (Nekrosevolumen / Tumolvolumen), das eher ein Malignitäts- als ein Hypoxiemarker ist, zeigte sich eine positive Korrelation zwischen großem Volumen und hoher OPN-Plasmakonzentration. Die Gesamtüberlebenszeit war bei Patienten mit hoher OPN-Plasmakonzentration verkürzt.

Osteopontin ist nach den vorliegenden Daten ein viel versprechender Plasmamarker der Tumormalignität bei malignen Gliomen und wird vermutlich hauptsächlich von infiltrativen Tumorzellen im makroskopisch gesunden Umgebungsparenchym gebildet. Diese können bei der Operation nicht entfernt werden, deshalb steigt die OPN-Plasmakonzentration postoperativ weiter an. Die Eignung von OPN als Hypoxiemarker bei malignen Gliomen bleibt unklar, weil das Volumen der zentralen Tumornekrose als Surrogatparameter der Tumorphoxie nicht ausreichend validiert ist.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	- 1 -
1.1 Maligne Gliome .....	- 1 -
1.1.1 Epidemiologie und Einteilung .....	- 1 -
1.1.2 Pathologie .....	- 1 -
1.1.3 Symptomatik und Diagnostik .....	- 2 -
1.1.4 Therapie .....	- 3 -
1.2 Tumorhypoxie.....	- 4 -
1.2.1 Was ist Tumorhypoxie?.....	- 4 -
1.2.2 Klinische Bedeutung der Tumorhypoxie.....	- 5 -
1.2.3 Nachweisverfahren für Tumorhypoxie.....	- 6 -
1.2.4 Möglichkeiten der spezifischen Therapie hypoxischer Tumore.....	- 8 -
1.3 Osteopontin.....	- 11 -
1.3.2 Funktion.....	- 12 -
1.3.3 Bedeutung in Tumoren .....	- 15 -
1.3.4 Potentieller diagnostischer und therapeutischer Wert .....	- 17 -
1.4 Die Rolle von Hypoxie und Osteopontin in malignen Gliomen.....	- 20 -
1.4.1 Maligne Gliome und Tumorhypoxie .....	- 20 -
1.4.2 Maligne Gliome und Osteopontin.....	- 21 -
2. Zielstellung.....	- 22 -
3. Patienten und Methoden.....	- 23 -
3.1 Patienten.....	- 23 -
3.1.1 Einschlusskriterien und Patienteneigenschaften.....	- 23 -
3.1.2 Therapieablauf .....	- 23 -
3.2 Bestimmung der OPN-Plasmakonzentration .....	- 24 -
3.2.1 Gewinnung der Plasmaproben .....	- 24 -
3.2.2 Durchführung der ELISA .....	- 25 -
3.3 Vermessung von Tumor- und Tumornekrosevolumen.....	- 26 -
3.3.1 Volumen der zentralen Tumornekrose als Surrogatparameter für das Ausmaß der Tumorhypoxie.....	- 26 -
3.3.2 Vorgehensweise bei der Vermessung der Volumenparameter .....	- 27 -
3.3.3 Vergleichbarkeit von Volumenwerten aus MRT- und CT-Bildern ....	- 28 -
3.5 Statistische Auswertung.....	- 30 -
4. Ergebnisse .....	- 32 -
4.1 Veränderung der OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf.....	- 32 -
4.1.1 OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf, Gesamtkollektiv .....	- 32 -
4.1.2 OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf abhängig vom Operationsverfahren .....	- 33 -
4.1.3 OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf abhängig von der Bestrahlungsdosis.....	- 34 -
4.2 OPN-Plasmakonzentration abhängig vom WHO-Grad.....	- 35 -
4.3 OPN-Plasmakonzentration abhängig von den vermessenen Volumina .....	- 36 -
4.3.1 Absolutes Nekrosevolumen .....	- 36 -
4.3.2 Absolutes Tumolvolumen.....	- 38 -
4.3.3 Relatives Nekrosevolumen .....	- 40 -
4.4 Ergebnisse zur Gesamtüberlebenszeit .....	- 42 -

4.4.1	Gesamtüberlebenszeit abhängig von der OPN-Plasmakonzentration, Gesamtkollektiv .....	- 42 -
4.4.2	Gesamtüberlebenszeit abhängig von bekannten Risikofaktoren (Resektionsausmaß, Lebensalter und Tumorstadium) .....	- 43 -
4.4.3	Gesamtüberlebenszeit abhängig von der OPN-Plasmakonzentration in nach Risikofaktoren definierten Untergruppen .....	- 44 -
4.4.4	Gesamtüberlebenszeit abhängig vom relativen Nekrosevolumen .....	- 45 -
5.	Diskussion .....	- 46 -
5.1	Veränderung der OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf.....	- 46 -
5.1.1	Einfluss des Operationsverfahrens.....	- 47 -
5.1.2	Einfluss nicht-tumorassoziierter OPN-Sekretion.....	- 47 -
5.1.3	Einfluss erschwerter Diffusion .....	- 48 -
5.1.4	Einfluss postoperativ in situ verbleibender Tumorzellen .....	- 48 -
5.1.5	Einfluss der Blut-Hirn-Schranke .....	- 49 -
5.1.6	Einfluss der Bestrahlung.....	- 51 -
5.2	Zusammenhang zwischen der OPN-Plasmakonzentration und dem Tumorstadium maligner Gliome.....	- 52 -
5.3	Zusammenhang zwischen der OPN-Plasmakonzentration und den radiologisch vermessenen Volumenparametern .....	- 53 -
5.3.1	Einfluss von „Ausreißen“ auf die errechneten Signifikanzwerte .....	- 53 -
5.3.2	OPN als Plasmamarker der Gewebehypoxie maligner Gliome.....	- 54 -
5.3.3	OPN als Plasmamarker der Malignität maligner Gliome .....	- 55 -
5.3.4	Korrelation der präoperativen Volumenparameter mit postoperativen OPN-Werten.....	- 56 -
5.4	Zusammenhang zwischen der OPN-Plasmakonzentration und der Gesamtüberlebenszeit .....	- 57 -
5.4.1	Einfluss des Abnahmezeitpunktes .....	- 57 -
5.4.2	Einfluss von Resektionsausmaß, Lebensalter und Tumorstadium .....	- 58 -
5.5	Schlussfolgerung.....	- 59 -
6.	Zusammenfassung.....	- 60 -
7.	Literaturverzeichnis.....	- 61 -
8.	Thesen .....	- 79 -

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ARCON	accelarated radiotherapy, carbogen, nicotinamide
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	zweiwertiges Kalzium-Ion
CA-IX	Carboanhydrase 9
CD-44	Cluster of differentiation 44 (Zellrezeptor, unter anderem für OPN)
CT	Computertomographie
C-terminal	carboxyterminal (Richtungsangabe auf der DNA)

DNA	Desoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Nachweismethode für Proteine)
Eta-1	early t-lymphocyte activator (Synonym für OPN)
EZM	Extrazellulärmatrix
GBM	Glioblastoma multiforme (Glioblastom)
GLUT-1	Glukose-Transporter 1
GRGDS	Glycin-Arginin-Glycin-Aspartat-Serin (wichtige Domäne von OPN)
Gray	Gray (Einheit der Energiedosis)
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$
kDa	Kilo-Dalton (Einheit der Teilchenmasse)
Konz.	Konzentration
kum.	kumulatives
LJ	Lebensjahr
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Messenger-Ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
NO	Stickstoffmonoxid
N-terminal	aminoterminal (Richtungsangabe auf der DNA)
OPN	Osteopontin
PET	Positronenemissionstomographie
PI3	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PSA	prostataspezifisches Antigen
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
rel.	relatives
RGD	Kurzform von GRGDS (siehe oben)
RNA	ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid
T0-4	Blutabnahmezeitpunkt 0-4
uPA	Urokinase-type Plasminogen-Activator
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation (zugleich gängigste Hirntumorklassifikation)
ZNS	zentrales Nervensystem

# **1. Einleitung**

## **1.1 Maligne Gliome**

### **1.1.1 Epidemiologie und Einteilung**

Bei etwa 70% der insgesamt seltenen malignen, primären Hirntumore handelt es sich um maligne Gliome (jährliche Inzidenz ca. 5 / 100.000 Einwohner). Davon sind 60-70% Glioblastome (Glioblastoma multiforme, GBM, WHO°IV), die bösartigsten Hirntumore überhaupt. Weitere Vertreter sind anaplastische Astrozytome (10-15%, WHO°III), anaplastische Oligodendrogliome (10%, WHO°III) und seltene histologische Subtypen. Die Inzidenz maligner Gliome ist in den letzten Jahrzehnten leicht gestiegen, wohl aufgrund gesteigener Lebenserwartung und verbesserter Diagnostik. Das mittlere Erkrankungsalter liegt beim Glioblastom im 64., bei anaplastischen Gliomen im 45. Lebensjahr. Männer erkranken etwas häufiger als Frauen.

Statistisch gesicherte Risikofaktoren sind nur ionisierende Strahlung und familiäre Häufung. Prognostisch ungünstig wirken höheres Lebensalter, ein nicht resezierbarer Tumorrest und ein niedriger Karnofsky-Index, also eine geringe Restselbstständigkeit. Bei optimaler Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit bei Glioblastomen ca. 12-15 Monate, bei Grad-III-Gliomen 2-5 Jahre. Die „Heilung“ gilt weiterhin als unmöglich.

### **1.1.2 Pathologie**

Maligne Gliome entstehen meist subkortikal in den Großhirnhemisphären, vermutlich aus neuronalen oder glialen Stammzellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Alle Lappen können betroffen sein, am häufigsten Frontal- und Temporallappen. Bei Lokalisation im Balken wachsen sie oft als „Schmetterlingsgliom“ beidseits ins Frontalhirn ein. Auch in Thalamus und Hirnstamm gibt es maligne Gliome.

Sie wachsen relativ rasch, zeigen eine tiefe Infiltration des gesund erscheinenden Parenchyms, sind stark vaskularisiert, neigen zu Einblutungen und zur Ausbildung eines erheblichen perifokalen Ödems, zum Teil bis zur kompletten Hemisphärenschwellung.

Wie für alle primären Malignome des ZNS gelten klassische Malignitätskriterien nur eingeschränkt. Eine Infiltration benachbarter Gewebe wie Dura und Schädelknochen ist sehr selten, eine hämatogene Streuung extrem selten. „Abtropfmetastasen“ im

Liquorsystem kommen gelegentlich vor, ein multilokuläres Auftreten innerhalb des Gehirns (Gliomatosis cerebri) ist relativ häufig.

Das anaplastische Astrozytom unterscheidet sich von den gutartigen Astrozytomen durch eine erhöhte Zelldichte und Mitoserate, Kernatypien wie Größenvarianz und Hyperchromasie und die Neigung zur Kontrastmittelanreicherung.

Das Glioblastom zeigt zusätzlich atypische Mikrogefäßproliferationen, oft mit einem glomeruloiden Muster. Häufig sind mehrkernige Riesenzellen und strichförmige oder flächige Nekrosen, um die sich die Tumorzellen radiär anordnen (Palisadenstellung).

Das anaplastische Oligodendrogliom ist sehr zellreich, neigt zu Verkalkungen und zeigt die so genannte „Honigwabenarchitektur“: Isomorphe Zellen, deutlich sichtbare Zellmembranen, wasserhelles Zytoplasma, zentralständiger Kern (Kleihues et al., 2005).

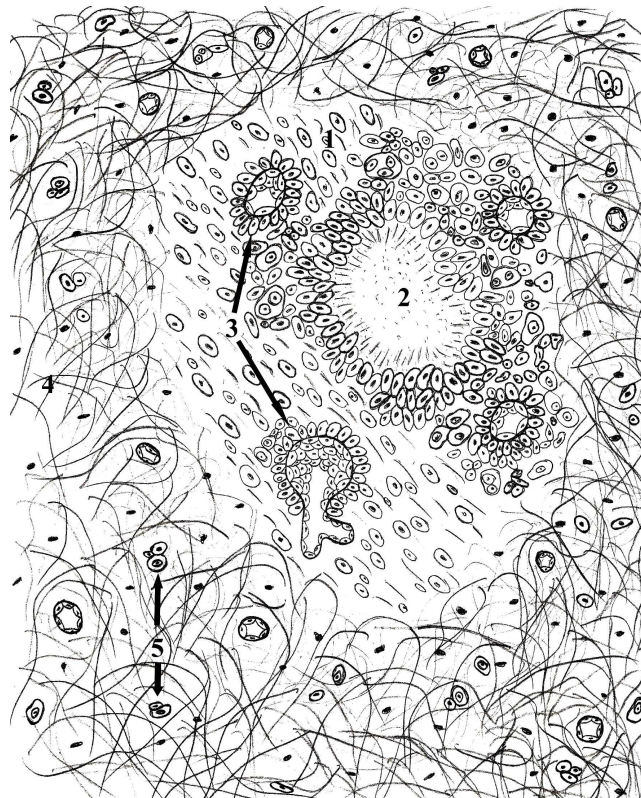


Abb.1 - Exemplarische Darstellung der Histologie eines Glioblastoms. Dargestellt ist vitales Tumorgewebe mit polymorphen Zellen, Kernatypien und mehrkernigen Tumorriesenzenellen (1), eine flächenhafte Nekrose mit typischer Palisadenstellung der umgebenden Tumorzellen (2), atypische Tumorblutgefäße mit teilweise glomeruloidem Wuchsmuster (3), das Neuropil des umgebenden Hirnparenchyms mit einzelnen Kapillaren (4) und diffus in das Normalgewebe infiltrierende Tumorzellen (5). (modifiziert nach Schlote et al., 1999)

### 1.1.3 Symptomatik und Diagnostik

Häufige Initialsymptome sind Kopfschmerz, meist als typischer Hirndruckkopfschmerz mit Übelkeit und morgendlichem Maximum, außerdem Verwirrtheit, Gedächtnisverlust,

Persönlichkeitsveränderung, Krampfanfälle und fokale-neurologische Ausfälle bis hin zur Halbseitensymptomatik.

Wichtigstes Diagnostikum ist heute das MRT, im Akutfall auch das CT. Beide zeigen eine inhomogene Tumormasse, das Marklagerödem und eine unregelmäßige Kontrastmittelanreicherung, die beim Glioblastom meist randbetont ist (Ring- oder Girlandenform). Dies ist das radiologische Korrelat der sehr häufigen und für diese Arbeit wichtigen zentralen Tumornekrose und ihren vitalen Randsaum.

Die Diagnosesicherung kann aber nach wie vor nur histologisch erfolgen, weshalb vor Beginn der spezifischen Therapie immer eine Resektion oder Biopsie angestrebt wird.

#### **1.1.4 Therapie**

Neben der supportiven Therapie besteht die Standardtherapie aller malignen Gliome heutzutage aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie. Oligodendrogliome sprechen insgesamt besser auf die Therapie an als Astrozytome.

Die Operation sollte möglichst eine makroskopische Totalresektion erreichen, also die restlose Entfernung des makroskopisch sichtbaren Tumorgewebes. Dies stellt einen signifikanten Überlebensvorteil dar (*Stummer et al., 2008*). Wegen der diffusen Infiltration gesunden Nachbargewebes verbleiben jedoch stets Tumorzellen in situ.

Die Bestrahlung verlängert die mittlere Überlebenszeit gegenüber der alleinigen Operation von 3-4 auf 7-12 Monate. Üblich ist heute eine Mehrfeldbestrahlung mit einer Gesamtdosis von 60 Gy in Fraktionen von 1.8 bis 2.0 Gy an 5 Tagen/Woche. Bei schlechtem Allgemeinzustand wird oft auch verkürzt und geringer fraktioniert bestrahlt. Für die adjuvante Chemotherapie hat sich seit 2006 das Zytostatikum Temozolomid durchgesetzt, das die mittlere Überlebenszeit von Glioblastompatienten von 12.1 auf etwa 14.6 Monate und die 2-Jahresüberlebensrate von 10.4 auf 26.5 % steigern konnte (*Stupp et al., 2005*).

Trotz optimaler Therapie rezidivieren wegen ihres infiltrativen Charakters nahezu alle malignen Gliome lokal, also am Ort ihrer Erstmanifestation - GBM im Mittel 7 Monate nach Therapieende. Eine einheitliche Rezidivtherapie ist nicht etabliert, da weder Operation, noch Bestrahlung, noch Chemotherapie überzeugende Erfolge erzielen.

(*Wen und Kesari, 2008; Hacke et al., 2010*).



## 1.2 Tumorhypoxie

### 1.2.1 Was ist Tumorhypoxie?

Ein wesentliches Problem, das ein entartendes Gewebe in seiner Entwicklung zur Bösartigkeit zu meistern hat, ist die Sicherstellung der Sauerstoffversorgung durch Stimulation der Angiogenese. Andernfalls könnten sich die neoplastischen Zellen nur wenige Mikrometer von bestehenden Blutgefäßen entfernen, eben soweit wie die passive Sauerstoffdiffusion funktioniert. Solche Tumore blieben deshalb mikroskopisch klein.

Die notwendige Angiogeneseförderung gelingt malignen Tumoren beispielsweise durch die enthemmte Synthese angiogener Faktoren wie Vascular endothelial growth factor (VEGF). So konnte bereits 1993 gezeigt werden, dass monoklonale VEGF-Antikörper in Mausmodellen verschiedener humaner Tumore, einschließlich des Glioblastoms, die Blutgefäßdichte und das Tumorwachstum signifikant hemmen (*Kim et al., 1993*).

Tumorblutgefäße sind jedoch pathologische Blutgefäße, die in ihrer Qualität und Verteilung nicht mit physiologischen Arteriolen, Venolen und Kapillaren vergleichbar sind. Zu diesen können sie im chronisch inflammatorischen Mikromilieu des Tumors nicht ausreifen. Pathologische Blutgefäße verzweigen sich irregulär, die Bedeckung mit Perizyten ist unregelmäßig, Permeabilität und proteolytische Aktivität sind erhöht und es kommt häufiger zu Hämorrhagien (*Furuya et al., 2005*). Die Oxygenierung von Tumorgewebe ist deshalb trotz Vaskularisation oft sehr inhomogen. Norm-, hyp- und anoxisches Gewebe können nebeneinander vorkommen.

Man unterscheidet diffusions- und perfusionslimitierte Hypoxie des Tumorgewebes:

Diffusionslimitierte Hypoxie entsteht bei zu großem Abstand zur nächsten perfundierten Kapillare. Laut dem Krogh'schen Zylindermodell fällt um eine Kapillare herum, sofern keine ausreichende Kapillardichte besteht, nach allen Seiten der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) gleichmäßig ab, von norm-, über hyp- bis anoxisch nach etwa 30  $\mu m$  (*Grote und Pohl, 2005*). Dieser Zustand ist chronisch, im anoxischen Bereich entsteht eine Nekrose. Perfusionslimitierte Hypoxie entsteht dagegen durch rezidivierende Okklusionen minderwertiger Tumorgefäße mit intermittierender, akuter Hyp- und Anoxie im abhängigen Gewebe.

### 1.2.2 Klinische Bedeutung der Tumorhypoxie

Tumorhypoxie ist ein klassischer negativer Prognosefaktor für den Verlauf maligner Tumore. So waren nach 18 Monaten von 22 Weichteilsarkompatienten bei einem präoperativen Tumor-pO<sub>2</sub> von mehr als 10 mmHg noch 70%, bei niedrigerem pO<sub>2</sub> nur 35% der Patienten metastasenfrei (*Brizel et al., 1996*). Bei Bronchialkarzinomen korreliert ein niedriger Tumor-pO<sub>2</sub> mit einer erhöhten Rezidivrate (*Le et al., 2006*). Ähnliche Ergebnisse, teilweise auf Basis deutlich größerer Patientenzahlen, liegen für Zervix-, Kopf-Hals-, Mamma-, Prostata- und Leberzellkarzinome vor (*Wilson und Hay, 2011*). Für diesen Einfluss auf die Prognose gibt es zwei wesentliche Gründe.

#### 1. Begünstigung eines besonders malignen Phänotyps:

Tumorzellen scheinen unter dem zusätzlichen Selektionsdruck der Hypoxie tendenziell einen noch bösartigeren Phänotyp auszubilden.

Das liegt zum einen an der Auslese von Mutationen, die das Zellüberleben begünstigen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in hypoxischen Gewebsarealen in hohem Maße p53-defiziente Tumorzellen selektiert werden, die sehr resistent gegen den eigentlich durch die Hypoxie ausgeübten Apoptosereiz sind (*Graeber et al., 1996*).

Zudem werden auch im Rahmen der physiologischen Reaktion auf Sauerstoffmangel verstärkt Gene exprimiert, die die Zelle resistenter gegen schädigende äußere Einflüsse machen. So konnte gezeigt werden, dass der für die zelluläre Reaktion auf Hypoxie zentrale und später näher erläuterte Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) die verstärkte Expression von P-Glykoprotein induziert. Dieses ist ein primär aktiver Transporter, der körperfremde Moleküle unselektiv aus der Zelle pumpt und als eine Ursache multipler Zytostatikaresistenz gilt (*Comerford et al., 2002*). Diskutiert wird auch die verstärkte Expression von Enzymen der anaeroben Glykolyse oder von VEGF.

#### 2. Verstärkung der Therapieresistenz:

Alle Zellen, Tumor- wie Körperzellen, sind unter hypoxischen Bedingungen gegen Chemo- und Radiotherapie weniger sensibel als unter normoxischen.

Das liegt zum einen daran, dass Zellen bei Hypoxie sinnvollerweise ihren Stoffwechsel auf ein Mindestmaß reduzieren und die Proliferation einstellen. In einer Studie konnten

Tumorzellen fast nie zugleich mit einem Hypoxie- und einem Proliferationsmarker angefärbt werden (*Durand und Raleigh., 1998*). Nun ist aber gerade die erhöhte Proliferationsrate maligner Gewebe ein wesentlicher Grund für ihre erhöhte Sensibilität gegen Chemo- und Radiotherapie. Bei reduziertem Zellstoffwechsel fallen DNA-Schäden weniger ins Gewicht und können durch die Zellen meist repariert werden bevor sie weiteren Schaden anrichten.

Eine Rolle spielt auch, dass hypoxisches Gewebe schlecht durchblutet ist und deshalb durch Zytostatika nur schwer erreicht werden kann (*Vaupel et al., 2001*).

Die höhere Strahlenresistenz lässt sich zudem durch den so genannten Sauerstoffeffekt erklären: Zellen sind in Anwesenheit von Sauerstoff 2.5- bis 3-mal sensibler gegenüber Röntgenstrahlung, weil diese in erster Linie indirekt wirkt, nämlich über die Bildung freier Radikale die erst sekundär zelluläre Moleküle schädigen. Freie Radikale sind sehr kurzlebig und Zellen besitzen wirkungsvolle Schutzmechanismen. Mit Sauerstoff können Radikale jedoch zu wesentlich stabileren, aber ebenso zytotoxischen Peroxyden reagieren und das schädigende Potential wird fixiert (*Münter, 2006*).

### **1.2.3 Nachweisverfahren für Tumorhypoxie**

Vor diesem Hintergrund wäre zweierlei wünschenswert: Mittel zur sicheren Diagnose der Tumorhypoxie zur frühzeitigen Risikostratifizierung und gezielten Anpassung der Therapie. Zweitens spezifische Therapien, die eine gezielte Reaktion auf die besondere Biologie hypoxischer Tumore erlauben, worauf später näher eingegangen wird. Verschiedene Methoden zum Nachweis der Tumorhypoxie sind, zumindest experimentell, etabliert:

#### **1. Direkte Messung mittels pO<sub>2</sub>-Mikroelektrode**

Die direkteste Methode ist die invasive Messung mit einer pO<sub>2</sub>-Mikroelektrode. Diese wird über mehrere Stichkanäle in den Tumor vorgeschoben, wobei jeweils 20-30 Messungen des pO<sub>2</sub> vorgenommen werden. Der so gemessene mittlere pO<sub>2</sub> liegt in verschiedenen Malignomen regelmäßig deutlich unter dem pO<sub>2</sub> der korrespondierenden Normalgewebe, so etwa in Kopf-Hals-, Bronchial-, Pankreas-, Zervix- und Prostatakarzinomen (*Brown und Wilson, 2004*).

## 2. Exogene Hypoxiemarker

Exogene Hypoxiemarker sind etwa die Nitroimidazole Pimonidazol und EF5. Sie reichern sich innerhalb einiger Stunden nach intravenöser Injektion in vitalen Zellen an, in denen der  $pO_2$  niedriger ist als 10 mmHg. Dies kann dann in Tumorbiopsien immunhistochemisch ausgewertet werden. Eine Anreicherung zeigt sich vor allem in Arealen, die mehr als 100  $\mu m$  von der nächsten durchbluteten Kapillare entfernt liegen, was auf eine chronische, diffusionslimitierte Hypoxie hinweist (*Rijken et al., 2000*). Die Pimonidazolanreicherung ist verstärkt nach Injektion von Hydralazin, das die Tumorperfusion reduziert, und verringert nach Inhalation von Carbogen, das wie später erläutert wird die Gewebeoxygenierung verbessert (*Ljungkvist et al., 2000*).

## 3. Endogene Hypoxiemarker

Endogene Hypoxiemarker sind Proteine, die an der physiologischen zellulären Reaktion auf Hypoxie beteiligt sind. In hypoxischen Zellen sind sie immunhistochemisch verstärkt nachweisbar. Wichtige Beispiele sind HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1), speziell dessen Untereinheit HIF-1 $\alpha$ , und die zahlreichen von HIF-1 $\alpha$  regulierten Genprodukte wie CA-IX (Carboanhydrase 9), GLUT-1 (Glukose-Transporter 1), Erythropoetin oder VEGF. Besonders wichtig für diese Arbeit ist OPN (Osteopontin), das bei Hypoxie unabhängig von HIF-1 $\alpha$  exprimiert und später erläutert wird.

HIF-1 $\alpha$  gilt als zentraler Sauerstoffsensor der Zelle. Es wird auch unter Normoxie exprimiert, aber nur bei Hypoxie stabilisiert und im Zellkern angereichert, was schon nach 2 Minuten Hypoxieeinwirkung nachweisbar ist (*Jewell et al., 2001*). Im Gegensatz zu den langsameren exogenen Hypoxiemarkern markiert HIF-1 $\alpha$  deshalb vermutlich auch akut hypoxisches Gewebe. Vielfach konnte eine negative prognostische Bedeutung der HIF-1 $\alpha$ -Akkumulation im Tumorgewebe nachgewiesen werden, etwa bei Kopf-Hals- und Zervixkarzinomen (*Winter et al., 2006; Burri et al., 2003*).

CA-IX und GLUT-1 werden bei Hypoxie HIF-1 $\alpha$ -abhängig verstärkt gebildet, werden also nach dem Beginn einer Hypoxie erst nach HIF-1 $\alpha$  im Gewebe nachweisbar. Deshalb wird wiederum eher chronisch hypoxisches Gewebe markiert. Für beide Marker ist eine prognostische Bedeutung bei bestimmten Tumorentitäten belegt. Eine hohe CA-IX-Expression war etwa bei 400 Mammakarzinompatientinnen mit größeren Tumoren, höherem Tumorstadium und einer schlechteren Prognose assoziiert (*Brennan*

*et al., 2006*) und ist außerdem ein negativer Prognosefaktor bei Zervix-, Kopf-Hals- und Bronchialkarzinomen. Eine hohe GLUT-1-Expression korrelierte beispielsweise bei Kolonkarzinompatienten mit einer verkürzten Überlebenszeit (*Haber et al., 1998*), außerdem bei Zervix- und Bronchialkarzinomen. (*Vordermark und Brown, 2003*)

#### 4. Plasmamarker der Tumorhypoxie

Der gemeinsame Nachteil aller bisher genannten Methoden ist ihre Invasivität. pO<sub>2</sub>-Mikroelektroden müssen in situ in den Tumor vorgeschoben werden und erreichen deshalb ohne chirurgischen Eingriff nur relativ oberflächliche Tumore wie Zervix- oder Kopf-Hals-Karzinome. Die anderen beiden Methoden erfordern die Gewinnung histologischen Materials, also wenigstens eine Biopsie. Als frühe Entscheidungshilfe für oder gegen eine hypoxiespezifische Therapie erscheinen deshalb alle bisher erläuterten Strategien nur eingeschränkt geeignet.

Optimal wäre ein endogener Hypoxiemarker, der hypoxieabhängig nicht nur lokal exprimiert, sondern außerdem auch sezerniert wird, im günstigsten Fall ins Blut. Als endogener Hypoxiemarker mit dieser entscheidenden Eigenschaft wird meines Wissens derzeit nur Osteopontin diskutiert, auf das später ausführlich eingegangen wird.

#### **1.2.4 Möglichkeiten der spezifischen Therapie hypoxischer Tumore**

Die gezielte Bekämpfung hypoxischer Tumore versucht man auf zwei Wegen zu erreichen. Erstens durch Verbesserung der Tumoroxygenierung zur Verstärkung der Wirksamkeit konventioneller Therapien. Zweitens durch Ausnutzung der Hypoxie als tumorspezifisches Merkmal durch Pharmaka, die selektiv hypoxische Zellen schädigen.

##### 1. Strategien zur Verbesserung der Tumoroxygenierung

Schon seit den 1960er Jahren hat man versucht, die Tumoroxygenierung zu verbessern, etwa durch Beatmung mit hochprozentigem Sauerstoff, Injektion vasoaktiver Substanzen kurz vor der Bestrahlung oder regelmäßige Transfusionen zur Erhöhung der Hämoglobinkonzentration im Blut. Seit Langem untersucht man auch „Hypoxic radiosensitizers“ wie Metronidazol und Misonidazol, die zwar die Tumoroxygenierung

nicht verbessern, aber durch Imitierung des Sauerstoffeffektes in hypoxischen Arealen den gleichen, positiven Effekt haben sollen.

Eine Metaanalyse erfasste über 10.000 Patienten aus Studien aus den 1960er bis 90er Jahren, in denen der Zusatz der oben genannten Strategien zur Bestrahlung erprobt wurde. Die regionale Tumorkontrollrate konnte demnach im Mittel um den Faktor 1.21 und die Gesamtüberlebensrate um 1.13 verbessert werden. Viele der Einzelstudien hatten aber auch keinen Effekt gezeigt (*Overgaard und Horsman, 1996*).

Zwei besonders interessante Weiterentwicklungen der genannten Strategien sind Nimorazol und das ARCON-Schema.

Nimorazol, ein mit Metro- und Misonidazol strukturverwandter „Hypoxic radiosensitizer“, erwies sich in einer großen, dänischen Studie an Kopf-Hals-Karzinom-Patienten als effektiver Zusatz zur konventionellen Bestrahlung. Die krebsspezifische 5-Jahres-Sterberate sank von 52 auf 41%, die regionale Tumorkontrollrate stieg von 33 auf 49% (*Overgaard et al., 1998*). Nimorazol gehört in Dänemark seitdem zur Standardtherapie von Kopf-Hals-Karzinomen, während verwandte Präparate teilweise enttäuschten, etwa Etanidazol bei Kopf-Hals-Karzinomen (*Eschwège et al., 1997*).

ARCON steht für „Accelerated radiotherapy, carbogen, nicotinamide“. Carbogen ist ein Gasgemisch aus reinem Sauerstoff und 2-5% Kohlendioxid zur Atmungsstimulation. Es soll die Ausnutzung der Sauerstoffbindungskapazität des Blutes verbessern und konnte in präklinischen Studien die chronische, **diffusionslimitierte** Tumorphypoxie reduzieren, etwa in einem Tiermodell humaner Larynxkarzinome (*Ljungkvist et al., 2000*). Nikotinamid verhindert intermittierende Gefäßverschlüsse, also **perfusionslimitierte** Hypoxie. Im Tierversuch konnte seine Injektion die bestrahlungsinduzierte Tumorzelltodesrate signifikant steigern (*Horsman et al., 1987*).

Eine Kombination beider Ansätze zum ARCON-Protokoll erscheint also sinnvoll, um beide Hypoxieformen zugleich zu bekämpfen. Seit den 1990er Jahren zeigten sich in vielen Studien viel versprechende Ergebnisse, etwa eine signifikant verbesserte 3-Jahres-Überlebensrate in einer aktuellen Studie an über 300 Harnblasenkarzinompatienten (*Hoskin et al., 2010*). Eine starke Pimonidazol-Anreicherung (exogener Hypoxiemarker) korrelierte bei Kopf-Hals-Karzinom-Patienten bei konventioneller Therapie mit einer schlechten Prognose, nicht aber bei einer ARCON-Therapie (*Kaanders et al., 2002*).

## 2. Strategien zur selektiven Schädigung hypoxischer Zellen

Eine wesentliche Herausforderung jeder Tumorthherapie ist die Unterscheidung von Tumorgewebe, das geschädigt, und Normalgewebe, das geschont werden soll. Hypoxie ist nahezu ein Spezifikum von Tumorgewebe, in gesundem Gewebe kommt sie kaum vor. Es liegt folglich nahe, diesen Umstand auszunutzen und Zytostatika zu entwickeln, die selektiv hypoxisches Gewebe angreifen, etwa relativ ungiftige Prodrugs, die erst unter hypoxischen Bedingungen zu zytotoxischen Radikalen reduziert werden.

Die Modellsubstanz solcher Pharmaka ist Tirapazamin. In einer multizentrischen Studie verlängerte dieses bei Bronchialkarzinom-Patienten die mittlere Überlebenszeit von 27.7 auf 34.6 Wochen durch Erhöhung der Cisplatin-Wirkung ohne Verstärkung der hämatologischen Nebenwirkungen. Dies spricht für eine verbesserte Tumorspezifität (von Pawel *et al.*, 2000). In einer ähnlichen Studie an 861 Kopf-Hals-Karzinom-Patienten war dagegen der Zusatz von Tirapazamin der alleinigen Standardtherapie nicht überlegen. Die Patienten waren allerdings nicht in Hinblick auf Tumorphoxie selektiert worden (Rischin *et al.*, 2010).

Eine andere Möglichkeit zur therapeutischen Ausnutzung der Hypoxie wäre die gezielte Hemmung der zellulären Hypoxieantwort. Mögliche Ansätze sind die spezifische Ausschaltung entscheidender Gene durch Small-interfering-RNA (siRNA), die Hemmung beteiligter Signalkaskaden oder spezifische Antikörper gegen wichtige Proteine, etwa HIF-1 $\alpha$ , CA-IX oder OPN.

Viele Arbeiten befassen sich mit der Inhibierung von HIF-1 $\alpha$  in Tumorzellen durch RNA-Interferenz, die meist zu deutlich reduzierter Proliferation, Angiogenese und Metastasierung führt. Beispielsweise bewirkte in humanen Zungenkarzinomzellen die Behandlung mit siRNA und Antisense-Oligonukleotiden gegen HIF-1 $\alpha$  in vitro eine verminderte Proliferations- und erhöhte Apoptoserate (Zhang *et al.*, 2004).

Pharmaka, die in wichtige Signalkaskaden der Hypoxieantwort eingreifen, sind etwa Rapamycin, das über den PI3-Kinase-Signalweg die HIF-1-Expression hemmt (Zhong *et al.*, 2000), oder Geldanamycin, das über die Hemmung von Hitzeschockprotein 90 den Abbau von HIF-1 $\alpha$  im Proteosom vermittelt (Isaacs *et al.*, 2002).

Die Hemmung von CA-IX durch den monoklonalen Antikörper WX-G250 hat sich vor allem gegen Nierenzellkarzinome als wirksam erwiesen (Bleumer *et al.*, 2006).

Auf die Hemmung von OPN wird später ausführlich eingegangen.

(Bache *et al.*, 2008; Vaupel und Mayer, 2007)

## 1.3 Osteopontin

### 1.3.1 Struktur

Osteopontin (OPN) ist ein unterschiedlich stark phosphoryliertes Glykoprotein der extrazellulären Matrix (EZM). Es existiert in EZM-gebundener und in löslicher Form. Letztere ist auch im Blut nachweisbar, eine für diese Arbeit entscheidende Eigenschaft. Es sind drei Isoformen bekannt, OPN a, b und c, mit vermutlich unterschiedlichen Funktionen, wie etwa an Zellen aus Bronchialkarzinomen und malignen Gliomen gezeigt werden konnte (*Goparaju et al., 2010; Yan et al. 2010*). Außerdem unterliegt OPN einer intensiven posttranslationalen Modifikation, etwa durch Phosphorylierung, Sulfatierung oder Glykosylierung. Dies alles weist bereits auf die vielfältigen Funktionen des Proteins hin.

Bei einer Länge von ca. 300 Aminosäuren besitzt OPN ca. 50 Bindungsstellen für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und hat insbesondere auch eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit. Gebundene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen könnten die Konformität und Funktion von OPN zusätzlich beeinflussen.

Eine sehr wichtige Domäne von OPN enthält die Sequenz Glycin-Arginin-Glycin-Aspartat-Serin (GRGDS- oder kurz RGD-Domäne) (*Oldberg et al., 1986*). Damit bindet OPN an mindestens 7 verschiedene Integrine. Dies sind Transmembranproteine zur Herstellung einer mechanischen Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der EZM, die zugleich Rezeptorfunktionen haben. Die größte Bedeutung für die OPN-Funktion hat das in vielen Geweben verbreitete Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ .

Ein weiterer, RGD-unabhängiger Zellrezeptor für OPN ist CD-44, das vor allem als Rezeptor für Hyaluronsäure bekannt ist. Seine Expression ist mit der Progression verschiedener Tumore assoziiert. Die Bindung an CD-44 erfolgt über verschiedene Domänen in Kooperation mit Integrinen (*Katagiri et al., 1999*).

In unmittelbarer Nähe der RGD-Domäne kann OPN durch die Protease Thrombin gespalten werden, was für seine Funktionsregulation sehr wichtig ist. Verschiedene Zelltypen, wie Fibrosarkom-, Blasenkarzinom-, glatte Darmmuskelzellen und fetale Lungenfibroblasten, konnten nach Thrombinspaltung auf OPN deutlich besser RGD-abhängig adhären und migrieren als auf nativem OPN (*Senger et al., 1994*). Durch die Spaltung könnte die Affinität der RGD-Domäne für Integrine erhöht oder die Rezeptorinteraktion verändert werden (*Smith et al., 1996*). Zudem scheinen beide Spaltprodukte eigene Funktionen zu erfüllen. Am N-terminalen Fragment erhöht sich



die Affinität für Integrine, das C-terminale wirkt über CD-44 chemotaktisch, beispielsweise auf Makrophagen (*Weber et al., 2002*).

Es ist interessant, dass das Plasmaprotein Thrombin und OPN als hauptsächliches EZM-Protein vor allem bei gesteigerter Kapillarpermeabilität aufeinander treffen. Das passt gut zu der später erläuterten Rolle von OPN im Entzündungsprozess und in Tumoren, in denen häufig ein proinflammatorisches Mikromilieu herrscht.

### 1.3.2 Funktion

Wie bereits angedeutet besitzt OPN sehr vielfältige Funktionen in vielen verschiedenen Geweben. Es wurde beispielsweise nachgewiesen in mineralisierten Geweben wie Knochen, Zähnen und Knorpel, außerdem im Gehirn, in glatter Muskulatur, Prostata und Plazenta. Es bildet eine prominente Schicht auf dem Epithel vieler Hohlorgane wie Gallenblase, Nierentubuli, Pankreasgängen, Urogenitaltrakt, Bronchien, Milch-, Speichel- und Schweißdrüsen (*Brown et al., 1992*). Außerdem wird es von vielen Immunzellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten gebildet.

Vereinfachend zeigen sich drei Grundfunktionen: OPN ist erstens ein im Körper weit verbreiteter Inhibitor von Kalzifizierungsprozessen, zweitens in gebundener Form ein Strukturprotein der EZM und wirkt drittens in löslicher Form auf vielfältige Weise als Zytokin. Diese Grundfunktionen überschneiden sich, zumal sowohl die Struktur- als auch die Zytokinfunktion über Integrine und CD-44 vermittelt werden.

Die nachfolgend angeführten Funktionen erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

#### 1. Osteopontin als Inhibitor von Kalzifizierungsprozessen

In vielen durch ektopye Kalzifizierung bedrohten Geweben scheint OPN das Wachstum von Kalziumsalzkristallen durch seine hohe Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$  zu hemmen.

So erwies sich OPN in mehreren Studien als sehr starker Inhibitor des Wachstums von Hydroxylapatitkristallen, die in 29% aller Nierensteine enthalten sind und eventuell auch das Keimzentrum für Kalziumoxalatsteine, die häufigsten Nierensteine, bilden (*Beshensky et al., 2001; Hunter et al., 1996*).

Auch in verkalkten, nicht jedoch unverkalkten atherosklerotischen Plaques werden erhöhte OPN-Konzentrationen gemessen (*Dhore et al., 2001*). Offenbar hemmt OPN dort die Kalzifizierung, begünstigt aber im späteren Verlauf die Proliferation glatter

Muskelzellen (*Sodhi et al., 2001*). Gefäßmuskelzellen OPN-defizienter Mäuse verkalkten bei Inkubation in phosphatreichem Medium signifikant stärker als solche aus Wildtypmäusen, die stattdessen mit OPN-Sekretion reagierten (*Speer et al., 2005*).

Eine deutliche OPN-Expression wird auch in Speicheldrüsen beobachtet, etwa bei Ratten und Mäusen. Interessanterweise zeigte sich bei beiden Spezies die stärkste Expression in der Glandula submandibularis, also genau der Speicheldrüse, die beim Menschen besonders zu Sialolithiasis neigt (*Obermüller et al., 2006; Asaka et al., 2006*).

## 2. Osteopontin als Strukturprotein

OPN vermittelt die Adhäsion von Zellen, etwa Immun- und Endothelzellen, an die EZM. Es bindet einerseits an Matrixmoleküle wie Kollagen Typ 1 (*Kaartinen et al., 1999*) und andererseits an Integrine auf der Zelloberfläche, die ihrerseits eine mechanische Verbindung zu Aktinbestandteilen des Zytoskeletts herstellen.

Namensgebend ist die Rolle von Osteopontin als bedeutendes nicht-kollagenes Protein der Knochenmatrix, zu der es durch seine zahlreichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen und die Affinität zu Hydroxylapatit prädestiniert ist. Es ist nicht homogen in der Knochenmatrix verteilt, sondern besonders am Übergang zwischen mineralisierter und nicht-mineralisierter Matrix konzentriert, etwa in den Zementlinien um Knochenzellen (*McKee et al., 1992*). Dort inhibiert es eventuell wiederum die Mineralisierung und verhindert quasi die Einmauerung der Zellen in Knochensubstanz. OPN bildet im Knochen auch eine Verbindung zwischen organischen und anorganischen Bestandteilen und vermittelt zelluläre Reaktionen (*McKee und Nanci, 1996*). Es wird von Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten synthetisiert. Letztere werden durch OPN aktiviert (*Miyauchi et al., 1991*). Nach Ovariectomie verloren Wildtypmäuse ca. 60% ihres trabekulären Knochenvolumens, OPN-defiziente Mäuse nur ca. 10% (*Yoshitake et al., 1999*). OPN könnte also auch an der Pathogenese der Osteoporose beteiligt sein.

## 3. Osteopontin als Zytokin

Über die Bindung an Integrine und CD-44 entfaltet OPN diverse Botenstoffwirkungen. Allgemein übt OPN auf viele Zelltypen eine adhäsions- und motilitätssteigernde Wirkung aus. Es spielt etwa eine Rolle in der Nierenentwicklung beim Einwachsen der

Ureterknospe ins Metanephron und OPN-Antikörper konnten *in vitro* eine normale Tubulogenese verhindern (*Denda et al., 1998, Rogers et al., 1997*).

OPN bewirkt chemotaktisch die Migration von Makrophagen an den Ort einer Entzündung und dort deren Adhäsion, Akkumulation und Aktivierung (*Giachelli et al., 1998, Weber et al., 2002*). Es ist somit ein essentielles, frühes Bindeglied in der Aktivierungskaskade der unspezifischen, zellvermittelten Immunabwehr. Da diese von T-Helfer-1-Zellen reguliert wird, ist OPN auch unter dem Namen Eta-1 (early T-lymphocyte activator) bekannt. Es stimuliert die Bildung von Interleukin 12, einem wichtigen Mediator der T-Helfer-1-Zellen, und hemmt die Bildung von Interleukin 10, einem wichtigen Mediator der T-Helfer-2-Zellen und damit der spezifischen, humoralen Immunabwehr. OPN-defiziente Mäuse zeigen eine schwer geschädigte zellvermittelte Immunreaktion gegen virale und bakterielle Infektionen (*Ashkar et al., 2000*).

OPN vermittelt auch die Hemmung der NO-Synthese in Phagozyten. NO wirkt toxisch auf Krankheitserreger und Tumorzellen und aktiviert in Körperzellen die Apoptose. In einer Kokultur von Kolonkarzinomzellen und Makrophagen führte die Hemmung der hohen OPN-Expression der Tumorzellen zur signifikanten Steigerung der NO-Sekretion der Makrophagen, woraufhin die Proliferation der Tumorzellen signifikant reduziert und die Apoptose signifikant erhöht war (*Wai et al., 2006*).

Intensiv beforscht wird die Rolle von OPN in der Regulation der stressabhängigen Angiogenese, die nach Verletzungen oder bei Hypoxie einsetzt und von Malignomen ausgenutzt wird (*Weber, 2001*). OPN fördert chemotaktisch die Migration von Endothel- und Gefäßmuskelzellen und vermittelt zugleich integrinabhängig deren Adhäsion am Entzündungsort, wo die adhäsiven Eigenschaften von OPN infolge der dort verstärkt stattfindenden Spaltung durch Thrombin enorm gesteigert sind (*Liaw et al., 1994; Senger, 1996*). Außerdem verhindert OPN im blutserumfreien Milieu über Integrin  $\alpha v \beta 3$  die Apoptose von Endothelzellen (*Scatena et al., 1998*), was für die Einsprossung neuer Blutgefäße ins Gewebe unerlässlich sein dürfte. Folgerichtig bewirkten Antikörper gegen den wichtigen OPN-Rezeptor Integrin  $\alpha v \beta 3$  *in vitro* die Apoptose neu entstehender Tumorblutgefäße (*Brooks et al., 1994*).

Die Bedeutung von OPN in der stressabhängigen Angiogenese und im unspezifischen Immunsystem lassen an eine Rolle in der Wundheilung denken. Tatsächlich zeigte sich etwa eine verzögerte Heilung nach Korneaverletzung bei OPN-defizienten Mäusen (*Miyazaki et al., 2008*) und eine Funktion in der Frakturheilung, unter anderem durch Opsonisierung von Knochenrümern für die Phagozytose (*McKee et al., 2011*).

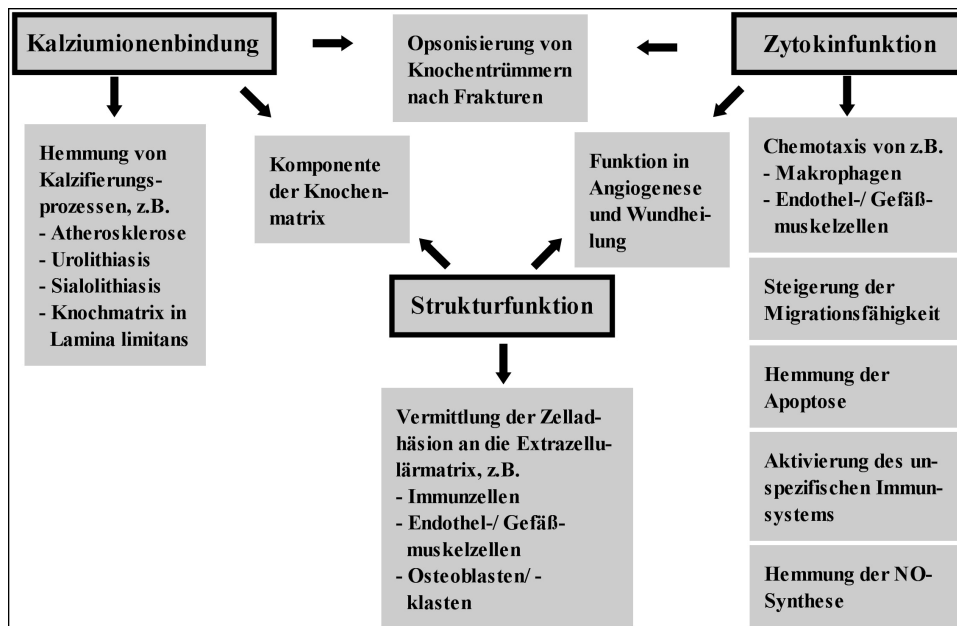


Abb.2 - Übersicht über die angeführten OPN-Funktionen, geordnet nach den drei genannten Grundfunktionen, deren vielfältige Überschneidungen angedeutet sind.

### 1.3.3 Bedeutung in Tumoren

Bei vielen Erkrankungen ist eine erhöhte OPN-Plasmakonzentration festgestellt worden, etwa bei koronarer Herzkrankheit (*Ohmori et al., 2003*), bei Sepsis (*Vaschetto et al., 2008*), während eines akuten Schubes einer Multiplen Sklerose (*Vogt et al., 2003*) oder bei fulminantem Leberversagen (*Arai et al., 2006*).

Medizinisch interessant wird OPN aber vor allem durch seine Rolle in der Tumorbilogie. Signifikante Überexpressionen konnten in vielen malignen Tumoren nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind viele Karzinome wie Kolon-, Magen-, Duodenum-, Pankreas-, Mamma-, Bronchial-, Blasen-, Prostata-, Ovarial-, Schilddrüsen-, Endometrium- und Nierenzellkarzinom, aber auch nicht-epitheliale Malignome wie malignes Melanom und malignes Gliom. Eine Studie fand immunhistochemisch eine intensive OPN-Expression in 71 von 76 untersuchten Karzinomen (*Brown et al., 1994*).

In malignen Tumoren übt OPN vielfältige Funktionen aus:

#### 1. Vermittlung von Normalgewebeeinfiltration und Metastasierung

Entsprechend seiner physiologischen Funktionen scheint OPN für Tumorzellen besonders für Prozesse wichtig zu sein, die eine adhäsive Interaktion mit der EZM

erfordern, wie Migration, Normalgewebsinfiltration und Metastasierung. Es induziert zudem die Synthese promigratorischer Proteasen. Wichtige Beispiele sind Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und Urokinase-type Plasminogen-Activator (uPA). Beide bewirken den für die Zellmigration essentiellen EZM-Abbau und die Aktivierung weiterer promigratorischer Faktoren – MMP direkt und uPA durch Aktivierung der unspezifischen Protease Plasmin (*Chambers und Matrisian, 1997; Blasi, 1999*).

Viele Studien beschäftigen sich deshalb mit dem Einfluss von OPN auf das Migrations- und Wachstumsverhalten von Tumorzellen. Humane Mammakarzinomzellen wurden durch OPN Integrin- $\alpha\beta 3$ -abhängig zu uPA-Sekretion, verstärkter Motilität und EZM-Infiltration angeregt (*Das et al., 2003*). Zellen aus oralen Plattenepithelkarzinomen zeigten nach OPN-Hemmung eine signifikant reduzierte Infiltrationsfähigkeit (*Muramatsu et al., 2004*). Über eine Erhöhung der Expression von MMP bewirkte OPN bei Chondrosarkomzellen eine Steigerung der Migration (*Chen et al., 2009*) und bei Melanomzellen eine verstärkte Migration und Infiltration (*Philip et al., 2001*).

## 2. Hemmung der Apoptose

Auch die antiapoptotische Wirkung von OPN und die Hemmung der NO-Synthese dürften für Malignome günstig sein. In vitro wurde das extrazelluläre Milieu der Dermis simuliert, das Melanomzellen normalerweise zur Apoptose anregt. In Anwesenheit von OPN konnten diese adhären und sich ausbreiten, ohne gingen sie in die Apoptose (*Geissinger et al., 2002*). OPN-defiziente Mammakarzinomzellen hatten eine erhöhte Apotoserate und tendenziell eine erhöhte Strahlensensibilität (*Hahnel et al., 2010*).

## 3. Förderung der Tumervaskularisierung

Entscheidend dürfte für schnell wachsende Tumore die OPN-abhängige Förderung der stressabhängigen Angiogenese sein. So führte OPN bei Mammakarzinomzellen zur VEGF-Expression und nach Transplantation der Zellen in Versuchsmäuse bewirkte die OPN-Hemmung eine verminderte Angiogenese in den entstehenden Tumoren (*Chakraborty et al., 2008*). OPN-Hemmung bewirkte in vitro in Endothelzellen aus Endometriumkarzinomen eine signifikante Reduktion von Migration, Infiltration und Röhrenbildung. Ebenso behandelte Endometriumkarzinomzellen bildeten signifikant kleinere Tumore mit geringerer Mikrogefäßdichte in Versuchsmäusen (*Du et al., 2009*).

<b>Förderung von:</b>	<b>Hemmung von:</b>
Motilität	Apoptose
Infiltration	NO-Synthese in Phagozyten
Metastasierung	
Angiogenese	

Abb.3 - Übersicht über die angeführten Funktionen von OPN in malignen Tumoren.

Die durch OPN geförderten Zellfähigkeiten Normalgewebeinfiltration, Metastasierung und Apoptosevermeidung sind Tumoreigenschaften, die den Begriff der Bösartigkeit definieren. Die Enthemmung der OPN-Synthese könnte deshalb geradezu eine Schlüsselmutation in der Entwicklung vom gutartigen zum bösartigen Tumor darstellen. Im Tierversuch bildeten Mammakarzinome mit gentechnisch gesteigerter OPN-Synthese signifikant mehr Metastasen als solche mit inhibierter Synthese, deren wenige Metastasen interessanterweise die OPN-inhibierende DNA-Sequenz wieder verloren hatten (*Suzuki et al., 2007*). Eine andere Arbeit identifizierte 99 Gene, deren Expression OPN signifikant beeinflusst. Diese lassen sich funktionell allen 6 „Hallmarks of Cancer“ zuordnen: Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Resistenz gegen Signale zur Wachstumshemmung, unendliches Teilungspotential, Vermeidung der Apoptose, Infiltrations- und Metastasierungsfähigkeit und stabile Angiogenese (*Cook et al., 2005*).

#### **1.3.4 Potentieller diagnostischer und therapeutischer Wert**

Wegen seiner offenbar wichtigen Rolle in Malignomen könnte OPN für die Tumorbehandlung großen diagnostischen und therapeutischen Wert besitzen:

##### **1. OPN als Tumormarker**

OPN ist im Blutplasma gut nachweisbar und könnte deshalb als Tumormarker für bestimmte Malignome interessant sein. Damit beschäftigen sich zahlreiche Studien.

Bei 51 Ovarialkarzinom-Patientinnen war die OPN-Plasmakonzentration im Vergleich zu Gesunden und Patientinnen mit benignen ovariellen Erkrankungen signifikant erhöht (*Kim et al., 2002*), ebenso bei 158 Bronchialkarzinom-Patienten verglichen mit Gesunden und Patienten mit nicht-neoplastischen Lungenkrankheiten und bei 66 Kopf-Hals-Karzinom-Patienten verglichen mit Gesunden (*Hu et al., 2005; Hui et al., 2008*). Oft besteht zudem ein Zusammenhang zwischen der OPN-Plasmakonzentration und der Prognose von Tumorpatienten. Bei niedriger OPN-Plasmakonzentration hatten 172 Bronchialkarzinom-Patienten eine signifikant längere Überlebenszeit als bei hoher, was auch unsere eigene Arbeitsgruppe bestätigen konnte (*Mack et al., 2008; Ostheimer und Vordermark, 2012*). Ein hoher OPN-Spiegel war bei 289 Prostatakarzinom-Patienten assoziiert mit einem frühen biochemischen Rezidiv (Wiederanstieg des PSA-Wertes) (*Vergis et al., 2008*) und bei 86 Weichteilsarkom-Patienten mit häufigerem Rezidiv und höherem Risiko auf einen tumorspezifischen Tod (*Bache et al., 2010*). 70 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom überlebten bei hohem OPN-Spiegel im Mittel 170 Tage, bei mittlerem 420 und bei niedrigem 650 (*Singhal et al., 1997*). Besonders eindrucksvoll ist eine Metaanalyse von 228 Studien über diverse Malignome. Insgesamt zeigt sich eine signifikante Korrelation einer hohen OPN-Expression mit hohem Tumorgrad, früher Progression und kurzer Überlebenszeit (*Weber et al., 2010*).

## 2. OPN als Plasmamarker der Tumorhypoxie

Wie bereits unter 1.2.3 angedeutet gilt OPN als endogener Hypoxiemarker. Bei 31 Kopf-Hals-Karzinom-Patienten zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen OPN-Expression und direkt gemessenem Sauerstoffpartialdruck im Tumor (*Bache et al., 2006*) und bei 69 Zervixkarzinom-Patientinnen mit der Expression der endogenen Hypoxiemarker GLUT-1 und VEGF, allerdings nicht mit der direkt gemessenen Tumoroxygenierung (*Sakata et al., 2006*). In einer anderen Studie führten intermittierende Hypoxie und Reoxygenierung *in vitro* zur verstärkten OPN-Sekretion durch verschiedene maligne Tumorzelllinien (*Said et al., 2005*).

Wie ebenfalls unter 1.2.3 erwähnt, wird OPN zudem wegen seiner guten Nachweisbarkeit im Blutplasma als einziger bekannter endogener Hypoxiemarker auch als Plasmamarker der Tumorhypoxie diskutiert. Bei zwei Patientengruppen mit Kopf-Hals- und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen war die OPN-Plasmakonzentration

umso höher und die Überlebenszeit umso kürzer, je niedriger der direkt bestimmte mittlere Sauerstoffpartialdruck im Tumor war (*Le et al., 2002; Le et al., 2006*).

Ein klinisch nützlicher Tumorphoxie-Marker sollte die Therapieentscheidung lenken können. Dazu gibt es unterschiedliche Ergebnisse. In einer Studie konnte in der Tat durch den „hypoxic Radiosensitizer“ Nimorazol der Strahlentherapieerfolg bei Kopf-Hals-Karzinom-Patienten mit hoher OPN-Plasmakonzentration deutlich verbessert werden, nicht aber bei niedriger oder mittlerer OPN-Konzentration (*Overgaard et al., 2005*). Dagegen ergab eine große, aktuelle Studie keinen Einfluss des OPN-Spiegels auf die Wirksamkeit des hypoxiespezifischen Zytostatikums Tirapazamin bei Kopf-Hals-Karzinomen. Allerdings hatte sich auch im Gesamtkollektiv kein signifikanter Zusammenhang von OPN-Konzentration und Prognose gezeigt (*Lim et al., 2012*).

### 3. OPN als therapeutischer Angriffspunkt

Zuguterletzt könnte OPN auch selbst als therapeutisches Ziel in der Tumorthherapie interessant sein. In der letzten Zeit wurden dazu einige Erkenntnisse *in vivo* gewonnen. Ein humanisierter OPN-Antikörper hemmte in Versuchsmäusen nach Implantation humaner Mammakarzinomzellen Primärtumorwachstum und Metastasierung (*Dai et al., 2009*). Die Hemmung der OPN-Expression durch RNA-Interferenz in Zelllinien aus kolorektalen Karzinomen und Prostatakarzinomen führte im Mausmodell zur Bildung signifikant kleinerer Tumore und *in vitro* zu erhöhter Radiosensitivität der kolorektalen Karzinomzellen (*Likui et al., 2011; Zhang et al., 2011*). In ähnlichen Experimenten mit Magen- und Ösophaguskarzinomzellen bildeten sich weniger Primärtumore und Metastasen und im Falle der Magenkarzinomzellen zeigten die Mäuse auch eine längere Überlebenszeit (*Wang et al., 2011; Ito et al., 2006*).

Diese Ergebnisse sind viel versprechend, es dürfte aber noch einige Zeit dauern, bis OPN-Inhibitoren auch für den klinischen Einsatz zur Verfügung stehen.

(*Denhardt und Guo, 1993; Rodrigues et al., 2007*)



## 1.4 Die Rolle von Hypoxie und Osteopontin in malignen Gliomen

### 1.4.1 Maligne Gliome und Tumorhypoxie

Maligne Gliome wachsen in der Regel sehr schnell und sind stark, aber unregelmäßig mit pathologischen Blutgefäßen vaskularisiert, weshalb es oft hypoxische Tumoreareale gibt (*Collingridge et al., 1999*), beispielsweise die häufige zentrale Nekrose.

Die meisten der im Folgenden dargestellten Studien beziehen sich auf das Glioblastom, das als häufigstes malignes Gliom Gegenstand der meisten Arbeiten zum Thema ist.

Auch bei malignen Gliomen verschlechtert Tumorhypoxie vermutlich die Prognose. In einer kleinen Studie an Patienten mit supratentoriellen Gliomen zeigte sich im Mittel eine geringe Anreicherung des exogenen Hypoxiemarkers EF5 bei WHO<sup>°</sup>II-Gliomen, eine mäßige bei WHO<sup>°</sup>III und eine starke bei Glioblastomen. In der gleichen und einer anderen kleinen Studie an Patienten mit hoch- und niedrigmalignen Gliomen konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Tumorgrad und dem direkt bestimmten Tumor-pO<sub>2</sub> nachgewiesen werden (*Evans et al., 2004; Lally et al., 2006*). In zwei weiteren Studien an Glioblastompatienten waren eine große hypoxische Tumormasse in der hypoxiespezifischen PET, einer weiteren Nachweismethode für hypoxisches Gewebe, und die erhöhte Expression des endogenen Hypoxiemarkers GLUT-1 mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit assoziiert (*Spence et al., 2008; Flynn et al., 2008*).

Folgerichtig werden hypoxiespezifische Therapieansätze bei Patienten mit malignen Gliomen seit längerem intensiv untersucht, bislang jedoch nur mit mäßigem Erfolg.

Bei 124 konventionell bestrahlten Glioblastompatienten brachte der „hypoxic Radiosensitizer“ Tirapazamin keinen signifikanten Überlebensvorteil (*Del Rowe et al., 2000*). Auch das bereits erläuterte ARCON-Protokoll hat in der Glioblastomtherapie enttäuscht. In einer Studie an 115 Patienten war die Überlebenszeit nicht verlängert, aber gastrointestinale und neurologische Nebenwirkungen verstärkt (*Miralbell et al., 1999*). Interessant sind ferner antiangiogene Pharmaka wie der monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab. Er beeinflusste in einer kleinen Studie an Patienten mit Glioblastomrezidiv die Tumorprogression günstig (*Vredenburgh et al., 2007*), bewirkte aber im Tierversuch in malignen Gliomen neben einer Blutflussverringerung auch die drastische Zunahme infiltrativer Tumorzellen und eine verstärkte HIF-1 $\alpha$ -Expression. Eventuell waren Tumorhypoxie und Tumorzell-Malignisierung bewirkt worden (*Keunen et al., 2011*).

Möglicherweise viel versprechend ist eine aktuelle Studie, in der 39 GBM-Patienten unmittelbar vor jeder Bestrahlungsfraction mit hyperbarem Sauerstoff beatmet worden waren und im Mittel 17.2 Monate überlebten (*Ogawa et al., 2012*).

#### **1.4.2 Maligne Gliome und Osteopontin**

Osteopontin wird in malignen Gliomen häufig verstärkt exprimiert, hemmt auch dort unter anderem die Apoptose und vermittelt die Infiltration der Tumorzellen ins Normalgewebe (*Ding et al., 2002; Yan et al., 2010*).

Interessant ist eine Studie an Ratten, die nach intrauteriner Behandlung mit N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff nach einigen Monaten konstitutiv Glioblastome entwickeln. In den Gehirnen dieser Ratten waren OPN-positive Astrozyten vor der Entwicklung des ersten Glioblastoms nie nachweisbar, in den Tumoren aber stets (*Jang et al., 2006*). Ist die Enthemmung der OPN-Synthese also auch für Glioblastome eine essentielle Mutation?

Die OPN-Expression scheint mit steigendem WHO-Stadium zuzunehmen. Eine Studie fand OPN in allen untersuchten Gliomzelllinien, hohe Expression in hoch- und niedrige in niedrigmalignen Astrozytomen und gesundem Hirngewebe (*Saitoh et al., 1995*). Per Immunhistochemie fand eine Studie OPN in 20 von 23 Glioblastomen, 11 von 13 Grad-III-Astrozytomen, aber nur 16 von 30 niedriggradigen Astrozytomen (*Takano et al., 2000*) und eine andere Studie fand eine signifikant höhere OPN-Expression in Grad-III- und -IV- als in Grad-I- und -II-Astrozytomen (*Toy et al., 2008*). Eine neuere immunhistochemische Studie ergab sogar eine stärkere OPN-Expression in Glioblastomen als in Grad-III-Astrozytomen (*Sreekanthreddy et al., 2010*).

Auch bei malignen Gliomen scheint eine hohe OPN-Expression mit einer schlechten Prognose einherzugehen. In einer Studie war eine hohe extrazelluläre OPN-Expression in Glioblastomen mit verstärkter Angiogenese und eine hohe intrazelluläre Expression mit verkürzter Überlebenszeit assoziiert (*Matusan-Ilijas et al., 2008*). Für diese Arbeit besonders interessant ist, dass im Blut von Glioblastompatienten präoperativ signifikant höhere OPN-Konzentrationen gemessen wurden als bei Grad-II- und -III-Astrozytom-Patienten. Die mittlere Überlebenszeit der Glioblastompatienten betrug 21 Monate bei niedrigem und 9 Monate bei hohem OPN-Spiegel (*Sreekanthreddy et al., 2010*).

Der in anderen Tumoren teilweise recht gut dokumentierte Zusammenhang zwischen einem hypoxischen Tumormilieu und der OPN-Expression ist in malignen Gliomen bisher kaum erforscht. Eine Studie untersuchte in vitro in drei malignen Gliomzelllinien

die Expression der endogenen Hypoxiemarker OPN, CA-IX, EPO, VEGF und HIF-1 $\alpha$ . Von diesen wurde am deutlichsten die Expression von OPN und CA-IX abhängig von Dauer und Schwere der Hypoxie gesteigert (*Said et al., 2007*).

Ob OPN auch in malignen Gliomen ein therapeutisch interessantes Zielmolekül ist, ist ebenfalls kaum erforscht. Die selektive Ausschaltung der OPN-Expression durch siRNA in Glioblastomzellen führte allerdings *in vitro* zur reduzierten Migrationsfähigkeit und zur Bildung signifikant kleinerer, langsamer wachsender Tumore (*Lamour et al., 2010*), außerdem zu reduzierter MMP-Sekretion und verminderter Invasionsfähigkeit der Tumorzellen (*Yan et al., 2010*).

## **2. Zielstellung**

Zusammenfassend ist es nach derzeitiger Studienlage sehr wahrscheinlich, dass bei Patienten mit malignen Gliomen sowohl das Ausmaß der im Tumorgewebe bestehenden Hypoxie als auch die Stärke der histologisch nachweisbaren OPN-Expression einen negativen Einfluss auf die Prognose haben. Bisher ist es jedoch nicht sicher, ob dabei die Hypoxie die OPN-Expression induziert. Dies ist aus anderen Malignomen bekannt, wurde aber bei malignen Gliomen bisher selten gezeigt.

Geht man davon aus, dass dieser Zusammenhang besteht, stellt sich die nächste Frage: Führt eine erhöhte OPN-Expression in malignen Gliomen zur proportionalen Erhöhung der OPN-Konzentration im Blutplasma, könnte OPN also ein geeigneter Plasmamarker der Tumorphoxie sein? Obwohl bekannt ist, dass OPN im Allgemeinen aus dem Gewebe auch ins Blut übertritt, muss dies nicht notwendigerweise auch auf OPN aus ZNS-Tumoren zutreffen. Es ist nicht sicher, wie gut OPN die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Bisher ist mir nur eine Arbeit bekannt, die auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Konzentration von OPN im Blut und der Überlebenszeit von Glioblastompatienten hinweist (*Sreekanthreddy et al., 2010*).

Gegen hypoxische Tumore stehen diverse experimentelle Therapieverfahren zur Verfügung. Deren Erfolge gegen maligne Gliome sind zwar bislang eher enttäuschend, es wird aber vor dem Hintergrund der nach wie vor extrem schlechten Prognose dieser Tumore weiter intensiv an neuen Therapien geforscht. Sollte eine effektive hypoxiespezifische Therapie gegen maligne Gliome entwickelt werden, wird es für die Therapieentscheidung essentiell sein, frühzeitig einfach und sicher nachweisen zu können, ob und in welchem Ausmaß im Tumor hypoxisches Gewebe vorhanden ist. Ein

Plasmamarker der Tumorphoxie wäre dazu besser geeignet als die etablierten, invasiven Methoden.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, bei Patienten mit neu diagnostiziertem malignem Gliom den Zusammenhang zwischen der OPN-Plasmakonzentration zu verschiedenen Therapiezeitpunkten, dem Ausmaß der Tumorphoxie und der Prognose zu untersuchen.

### **3. Patienten und Methoden**

#### **3.1 Patienten**

##### **3.1.1 Einschlusskriterien und Patienteneigenschaften**

Ich führte eine prospektive Beobachtungsstudie an Patienten der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Halle durch. Die Studie hat ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Halle erhalten. Eingeschlossen wurden Patienten mit radiologischem Verdacht auf ein malignes Gliom. Dazu zählte ich die drei Entitäten anaplastisches Astrozytom, Glioblastom und anaplastisches Oligodendrogliom. Voraussetzungen für einen Studieneinschluss waren ferner das vollendete 18. Lebensjahr und die unterschriebene Einverständniserklärung. Im Rekrutierungszeitraum von Dezember 2008 bis Juni 2010 wurden insgesamt 33 Patienten, 21 Männer und 12 Frauen, in die Studie eingeschlossen. Diese waren bei Studieneinschluss zwischen 23 und 83 Jahren alt, wobei 26 Patienten älter und 7 Patienten jünger als 50 Jahre waren. Von den Patienten hatten 21 ein Glioblastom, 9 ein anaplastisches Astrozytom und 3 ein anaplastisches Oligodendrogliom.

##### **3.1.2 Therapieablauf**

Die Patienten wurden unabhängig vom Studieneinschluss behandelt und es erfolgte keine studienbedingte Modifikation der leitliniengerechten Therapie.

Zunächst erfolgte stets ein operativer Eingriff an der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Halle, der die histologische Diagnose erbrachte. Es handelte sich dabei in 16 Fällen um eine makroskopische Totalresektion des Tumors, in 10 Fällen um eine Teilresektion und in 7 Fällen um eine Biopsie.

Außer bei zwei Patienten schloss sich daran eine Bestrahlung der Tumorregion in der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Halle an. Diese erfolgte nach individuell anhand des Gesamtzustandes des Patienten festgelegtem Therapieplan in Mehrfeldtechnik mit einer Gesamtdosis zwischen 36 Gy (als Ganzhirnbestrahlung) und 61.2 Gy. Die volle therapeutische Dosis um 60 Gy erhielten 20 Patienten. Zusätzlich wurde bei 19 Patienten eine Chemotherapie mit Temozolomid durchgeführt und zwar simultan zur Bestrahlung in einer Dosis von 75 mg/m<sup>2</sup>d, gefolgt von 6 Zyklen mit 150 mg/m<sup>2</sup>d über jeweils 5 Tage im 6-wöchigen Abstand.

## **3.2 Bestimmung der OPN-Plasmakonzentration**

### **3.2.1 Gewinnung der Plasmaproben**

Die OPN-Bestimmung erfolgte im Blutplasma. Um auch Erkenntnisse über die Entwicklung der OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf zu gewinnen, war es das Ziel, von jedem Patienten folgende vier Plasmaproben zu gewinnen:

- T0 präoperativ
- T1 unmittelbar vor oder bei Beginn der Bestrahlung
- T2 am Ende der Bestrahlung
- T3 im Rahmen der ersten routinemäßigen Verlaufsuntersuchung 4-8 Wochen nach Ende der Bestrahlung

Um die präoperative Plasmaprobe akquirieren zu können, musste der Studieneinschluss an der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Halle und bereits vor der histologischen Sicherung der Diagnose erfolgen. Deshalb wurden zahlreiche zunächst eingeschlossene Patienten, bei denen sich die radiologische Verdachtsdiagnose auf ein malignes Gliom histologisch nicht bestätigte, im Verlauf wieder aus der Studie ausgeschlossen. Die Plasmaproben dieser Patienten wurden vernichtet.

Es wurden, meist im Rahmen von Routineblutabnahmen, jeweils 9 ml venöses Blut in einem Blutplasmaröhrchen abgenommen, zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bei -80 °C eingefroren. Die Beschriftung aller Proben erfolgte pseudonymisiert.

Aufgrund organisatorischer Probleme zu Beginn der Studie fehlt die T0-Plasmaprobe leider bei 6 Patienten. Ferner fehlen die T1-Probe bei 3 und die T2-Probe bei 5 Patienten, was teilweise organisatorisch, teilweise aber auch durch den Therapieverlauf bedingt ist. Von 2 Patienten etwa konnte nur die T0-Probe gewonnen werden, da bei

ihnen wegen eines sehr schlechten Allgemeinzustandes nach der Operation von einer weiteren spezifischen Therapie abgesehen wurde. Am häufigsten, nämlich in 14 Fällen, fehlt jedoch die T3-Probe, weil bei Patienten mit ungünstigem Krankheitsverlauf oft keine strahlentherapeutische Wiedervorstellung mehr erfolgt ist und 5 Patienten zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben waren.

Tab.1 – Übersicht über die Anzahl der zu den verschiedenen Therapiezeitpunkten gewonnenen Plasmaproben im Verhältnis zu den jeweils noch eingeschlossenen Patienten.

Abnahmezeitpunkt	Vorhandene Plasmaproben	Eingeschlossene Patienten
T0	28	33
T1	30	33
T2	28	33
T3	19	28

### 3.2.2 Durchführung der ELISA

Der quantitative OPN-Nachweis erfolgte im Forschungslabor der Klinik für Strahlentherapie mittels ELISA. Verwendet wurde das „Human Osteopontin Assay Kit“ der Firma IBL.

Die Plasmaproben wurden mittels Vortex gleichmäßig durchmischt, mit Probenpuffer auf 5 % verdünnt und 100 µl dieser Probenlösung auf die mit OPN-Antikörpern vorbeschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde mit Klebeband abgedichtet und bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und die Platte trocken geklopft, gefolgt von 7 Waschschritten mit jeweils 300 µl Waschpuffer je Well. Nun wurden 100 µl des mit Verdünnungspuffer auf 3 % verdünnten Detektionsantikörpers je Well zugegeben, die Platte mit Klebeband abgedichtet und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde wiederum der Überstand abgegossen, die Platte trocken geklopft und 9-mal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Substratlösung (Chromogen) je Well und eine erneute Inkubation für 30 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Nach Abgießen des Überstands und Ausklopfen der Platte wurde die Detektionsreaktion mit 100 µl Stopplösung (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) je Well beendet und die Absorption der einzelnen Wells bei 450 nm im Photometer vermessen.

Es wurde für jede Platte eine Standardkurve ermittelt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt mit 200, 100, 25, 12.5, 6.25, 3.1 und 0 ng/ml OPN-Standard (rekombinantes humanes OPN).

Die OPN-Konzentration jeder Plasmaprobe und jeder Konzentrationsstufe der Verdünnungsreihe wurde in zwei Wells vermessen und aus beiden Werten wurde jeweils der Mittelwert berechnet. Als Negativkontrolle diente Giordano/ Ripa-Puffer, als interne Kontrolle eine der Plasmaproben der eingeschlossenen Patienten.

### **3.3 Vermessung von Tumor- und Tumornekrosevolumen**

#### **3.3.1 Volumen der zentralen Tumornekrose als Surrogatparameter für das Ausmaß der Tumorhypoxie**

Zur Abschätzung der Tumorhypoxie vermaß ich als Surrogatparameter das Volumen der zentralen Tumornekrose in radiologischen Schnittbildern. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass Nekrosezonen im Tumorrinneren Zeichen für eine dort insuffiziente Blutversorgung sind. Dabei dürfte im Bereich der Nekrose selbst Anoxie herrschen. Interessant war für mich der Randbereich der Nekrosezone, da dort entsprechend dem in 1.2.1 erläuterten Krogh'schen Zylindermodell mit zunehmendem Abstand zum suffizient perfundierten Tumorgewebe der Sauerstoffpartialdruck von Normoxie über Hypoxie bis zur anoxischen Nekrose abnehmen dürfte (siehe Abb. 4). Diese Annahme wird durch immunhistochemische Studien bestätigt, die in Glioblastomen eine besonders intensive Expression endogener Hypoxiemarker (HIF-1 $\alpha$ , OPN) an der Grenze zu Nekrosezonen nachweisen konnten (*Søndergaard et al., 2002, Sreekanthreddy et al., 2010*).

Die hypoxische Übergangszone als eigentliches hypoxisches Gewebsvolumen war für mich nicht direkt vermessbar, da diese noch partiell durchblutet ist und damit wie das umgebende normoxische Tumorgewebe Kontrastmittel aufnimmt. Ihr Volumen dürfte aber annähernd proportional zum Volumen der nicht Kontrastmittel aufnehmenden Nekrosezone sein. Deshalb habe ich das Volumen der Nekrosezone zur Abschätzung des Ausmaßes der Hypoxie herangezogen.

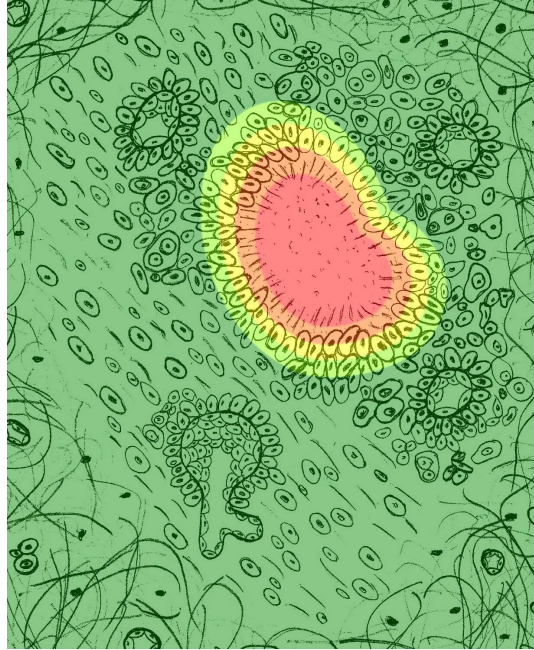


Abb.4 - Vereinfachte schematische Darstellung der angenommenen Oxygenierungsverhältnisse im Bereich der zentralen Nekrose eines malignen Gliomes unter Verzicht auf die Darstellung der perfusionslimitierten Hypoxie im durch atypische Blutgefäße versorgten Tumorgewebe. Man sieht mit zunehmender Entfernung zum letzten perfundierten Gefäß einen kontinuierlichen Abfall des Sauerstoffpartialdruckes von Normoxie (dunkelgrün), über immer ausgeprägtere Hypoxie (hellgrün, gelb, orange) bis hin zur anoxischen Nekrose (rot). (modifiziert nach Schlote et al., 1999)

Dieses absolute Volumen ist natürlich stark abhängig von der Gesamtgröße des Tumors, da ein großes Tumolvolumen per se ein größeres Nekrosevolumen beinhalten kann als ein kleines Tumolvolumen. Deshalb wurde zusätzlich auch das Gesamtvolumen der Tumore vermessen und nach der Formel  $\text{Nekrosevolumen/Tumolvolumen} \times 100$  das relative Nekrosevolumen berechnet, der prozentuale Anteil der Nekrose am Tumor. Somit standen mir letztlich drei Volumengrößen zur Verfügung: Das absolute Nekrosevolumen, das absolute Tumolvolumen und das relative Nekrosevolumen.

### 3.3.2 Vorgehensweise bei der Vermessung der Volumenparameter

Zur Vermessung von Nekrose- und Tumolvolumen verwendete ich in aller Regel die präoperativen kontrastmittelverstärkten Kranio-MRT-Aufnahmen der Patienten. Waren diese in Einzelfällen nicht vorhanden, habe ich auf kontrastmittelverstärkte CT-Aufnahmen zurückgegriffen. Nicht von allen Patienten gab es Schnittbildaufnahmen in ausreichender Qualität. Daten zum Tumolvolumen liegen für 29, zum Nekrosevolumen für 26 Patienten vor.



Die Vermessung erfolgte mittels des Bestrahlungsplanungsprogramms Oncentra-Masterplan, das die exakte schichtweise Markierung beliebiger Gewebareale in MRT- und CT-Aufnahmen erlaubt. Das eingezeichnete Volumen berechnet das Programm automatisch aus den Flächeninhalten der in den einzelnen Schichten markierten Areale, der Schichtdicke und der Anzahl der markierten Schichten.

Als Tumorzvolumen wurde der Raum definiert, der durch den äußeren Rand des Kontrastmittel aufnehmenden, vitalen Tumorgewebes begrenzt wird. Es lässt sich in der Regel scharf vom Parenchym abgrenzen und schließt die zentrale Nekrose mit ein.

Als Nekrosevolumen wurde das nicht oder nur unregelmäßig Kontrastmittel aufnehmende Areal definiert, das durch den stark kontrastierten vitalen Randsaum eingegrenzt wird (siehe Abb. 5 und 6).

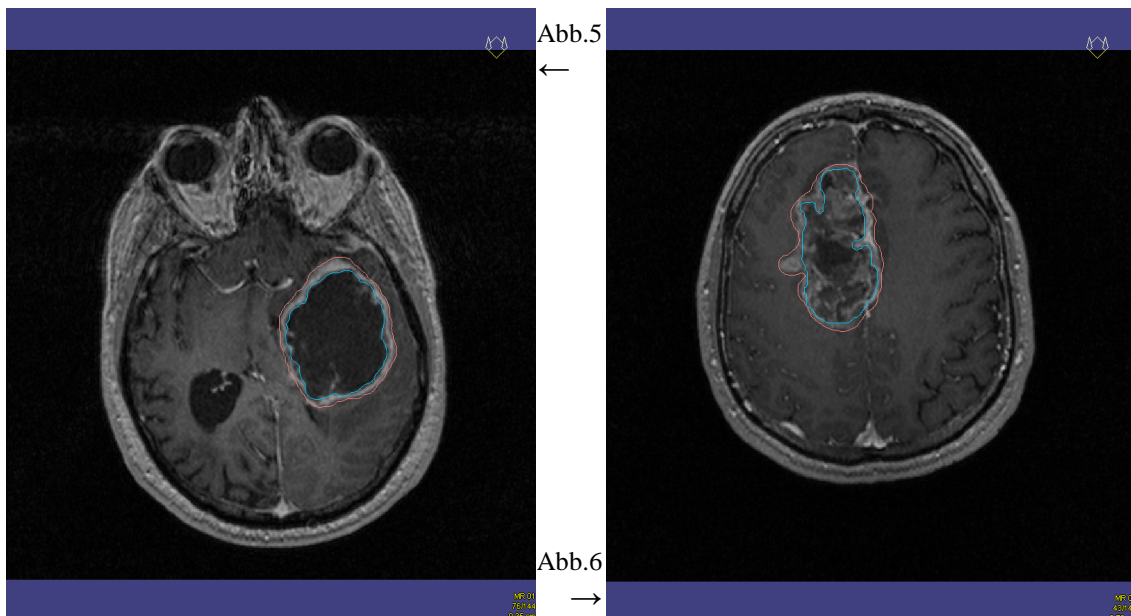


Abb. 5 und 6 - Beispielschichten aus T1-gewichteten, kontrastmittelverstärkten MRT-Aufnahmen mit markierten Tumor- (rosa) und Nekrosezonen (blau). Dabei stellt sich die Nekrose in Abb. 5 homogen hypointens dar, in Abb. 6 dagegen als unregelmäßig kontrastiertes Areal, das sich jedoch relativ gut gegen das stärker kontrastierte vitale Tumorgewebe abgrenzen lässt.

### 3.3.3 Vergleichbarkeit von Volumenwerten aus MRT- und CT-Bildern

Um sicherzugehen, dass die in CT-Aufnahmen vermessenen Volumenwerte mit denen aus MRT-Aufnahmen vergleichbar sind, führte ich eine kleine Stichprobe durch. Dazu verwendete ich Archivaufnahmen von Gliompatienten, die präoperativ sowohl ein kraniales MRT als auch ein CT erhalten hatten. Das Ergebnis dieser Stichprobe deutet

darauf hin, dass man die in MRT und CT vermessenen Volumenwerte durchaus miteinander vergleichen kann (siehe Tab. 2).

Tab. 2 - Vergleich der Messwerte, die sich nach Vermessung jeweils desselben Nekrosevolumens in MRT- bzw. CT-Aufnahmen ergeben, zur Verdeutlichung der Vergleichbarkeit entsprechender Messwerte aus beiden Schnittbildverfahren.

Patient	Nekrosevolumen MRT [cm <sup>3</sup> ]	Nekrosevolumen CT [cm <sup>3</sup> ]
1	3,8	4,3
2	52,6	50,7
3	3,4	3,0
4	34,3	37,5

### **3.4 Erfassung der Überlebenszeit und weiterer Daten**

Studienwichtige patientenbezogene Daten wurden den Patientenakten der Kliniken für Neurochirurgie und Strahlentherapie entnommen, so etwa die individuelle Therapie, Angaben zu Allgemeinzustand, Tumorhistologie, Begleiterkrankungen und Labordaten. Zusätzlich ermittelte ich nach Ablauf einer Nachbeobachtungszeit von im kürzesten Fall 15 Monaten per Melderegisterauskunft beim zuständigen Einwohnermeldeamt ob und wenn ja an welchem Tag die Patienten verstorben waren. Anhand dieser Angabe berechnete ich die Gesamtüberlebenszeit, die als Zeitraum vom Tag der ersten neurochirurgischen Operation bis zum Sterbetag definiert wurde. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes waren 24 Patienten verstorben, 8 waren noch am Leben. Zu einem ausländischen Patienten sind keine Angaben möglich, weil er unmittelbar nach Abschluss der Bestrahlung wieder in sein Heimatland gereist ist.

Die Speicherung sämtlicher Daten erfolgte pseudonymisiert.

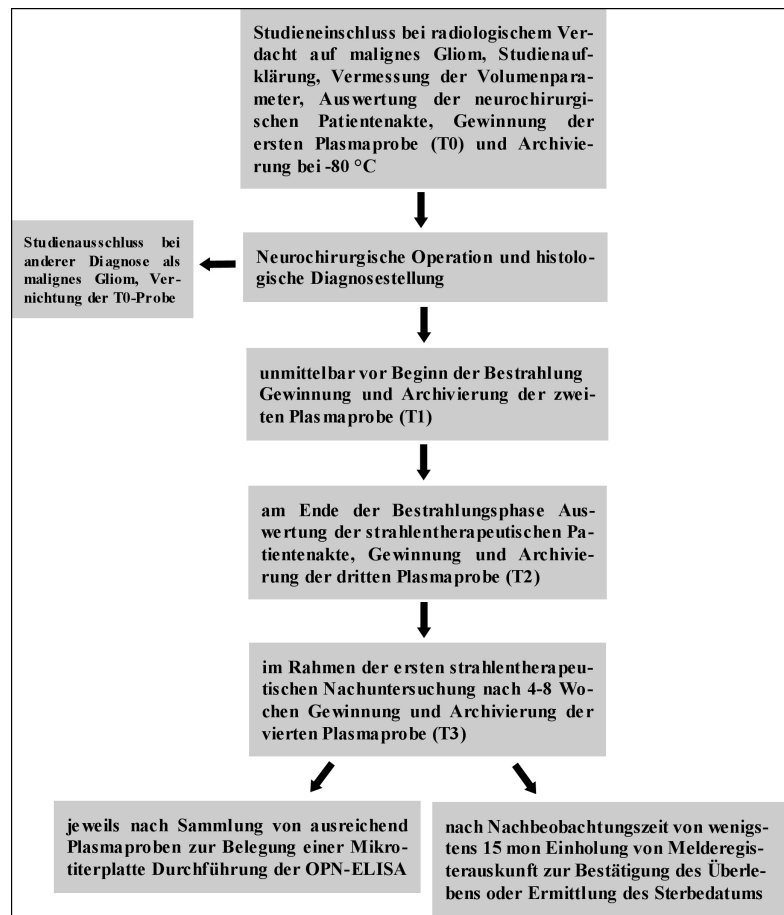


Abb. 7 – Übersichtsdarstellung des Studienablaufs

### 3.5 Statistische Auswertung

Für Signifikanzberechnungen wurde in der Regel der Mann-Whitney-U-Test verwendet, ein nicht-parametrischer Signifikanztest, der prüft, ob die Werte einer Stichprobe überzufällig häufig größer sind als die Werte einer anderen Stichprobe. Ein nicht-parametrischer Test wurde gewählt, weil die OPN-Konzentration von sehr vielen, mitunter krankheitsunspezifischen Parametern abhängig ist und deshalb zu großen inter- und intraindividuellen Schwankungen neigt. Ein nicht-parametrischer Signifikanztest wird durch die unvermeidlichen „Ausreißer“ weniger beeinflusst.

Die Visualisierung der Daten erfolgt meist als Balkendiagramm. In diesen ist stets die positive Standardabweichung mit dargestellt.

Vergleiche der Überlebenszeit von Subgruppen wurden mithilfe der Kaplan-Meier-Analyse durchgeführt. Diese ist speziell für Überlebenszeitanalysen entwickelt worden und berücksichtigt, dass das Ereignis, meist der Tod, bei einem Teil der Patienten bis zum Studienende noch nicht eingetreten ist und deshalb nur die Zeit zwischen

Einschluss und Studienende bekannt ist, nicht aber die Zeit bis zum Ereignis. Da dies in meiner Studie bei 8 Patienten der Fall ist, habe ich bei Vergleichen der Überlebenszeit auch nicht die mittlere, sondern die mediane Überlebenszeit angegeben. Eine mittlere Überlebenszeit lässt sich unter Berücksichtigung aller Patienten nicht berechnen, solange nicht alle Patienten verstorben sind. Eine mediane Überlebenszeit ergibt sich aus der Kaplan-Meyer-Analyse bereits, wenn noch 50% der Patienten am Leben sind. Nur bei einem kleinen Teil der betrachteten Subgruppen leben am Studienende noch über 50% der Patienten, sodass auch die Angabe einer medianen Überlebenszeit nicht möglich ist.

Als Signifikanztest wurde bei diesen Vergleichen der Log-Rank-Test verwendet. Dies ist ebenfalls ein nicht-parametrischer Test. Er berücksichtigt wie die Kaplan-Meyer-Analyse, dass das Ereignis nur bei einem Teil der Patienten eingetreten ist. Seine Anwendung ist auch auf jene Subgruppen möglich, von denen keine mediane Überlebenszeit angegeben werden kann.

Ein signifikanter Unterschied wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % angenommen ( $p < 0.05$ ) und mit \* gekennzeichnet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Veränderung der OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf

#### 4.1.1 OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf, Gesamtkollektiv

Betrachtet man das Gesamtkollektiv der Patienten, so zeigt sich tendenziell ein kontinuierlicher Anstieg der OPN-Plasmakonzentration bis zum Abnahmezeitpunkt T2.

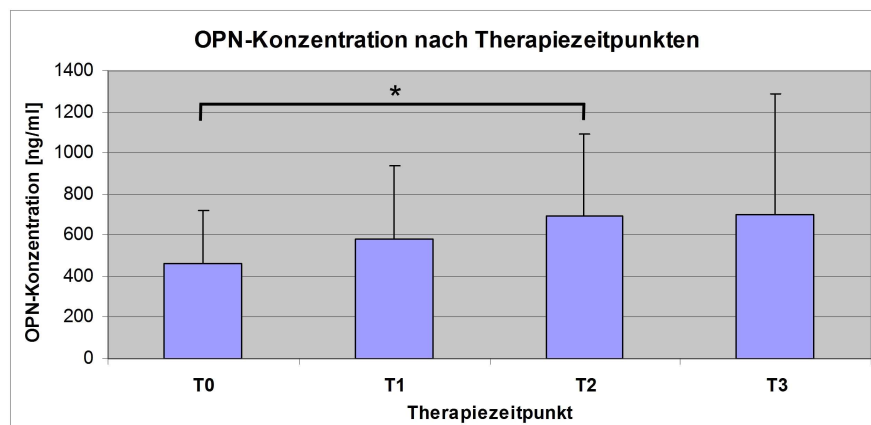


Abb.8 - Graphische Darstellung der OPN-Plasmakonzentration im Gesamtkollektiv für die vier Therapiezeitpunkte. Es zeigt sich eine tendenzielle Zunahme im Therapieverlauf, mit Signifikanz zwischen T0 und T2. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Die mittlere OPN-Konzentration lag zu den Zeitpunkten T0, T1, T2 und T3 bei 465, 582, 696 und 697 ng/ml. Dabei ist der Unterschied zwischen T0 und T2 signifikant ( $p = 0.01$ ). Zwischen T2 und T3 zeigt sich kein weiterer Anstieg, was aber eventuell dadurch zu erklären ist, dass Patienten mit hohen OPN-Werten besonders oft zur letzten Blutabnahme nicht mehr erschienen waren. Dies ist aus Abbildung 9 gut ersichtlich.

Um eine derartige Verzerrung auszuschließen, habe ich als nächstes jeweils zu zwei gegebenen Abnahmezeitpunkten nur die OPN-Plasmakonzentrationen solcher Patienten miteinander verglichen, von denen auch tatsächlich Messwerte zu beiden Abnahmezeitpunkten vorlagen. Von T0 zu T1 steigt bei dieser Betrachtungsweise die mittlere OPN-Plasmakonzentration von 443 auf 621 ng/ml ( $n = 25$ ;  $p = 0.045$ ), von T1 zu T2 von 606 auf 696 ng/ml ( $n = 28$ ; nicht signifikant), von T2 zu T3 von 585 auf 717 ng/ml ( $n = 18$ ; nicht signifikant), von T0 zu T2 von 465 auf 713 ng/ml ( $n = 23$ ;  $p = 0.03$ ), von T1 zu T3 von 520 auf 697 ng/ml ( $n = 19$ ; nicht signifikant) und von T0 zu T3 von 426 auf 631 ng/ml ( $n = 16$ ; Trend,  $p = 0.11$ ). Es zeigt sich von einem früheren zu

einem späteren Abnahmezeitpunkt stets ein tendenzieller Anstieg der OPN-Konzentration, auch von T2 zu T3.

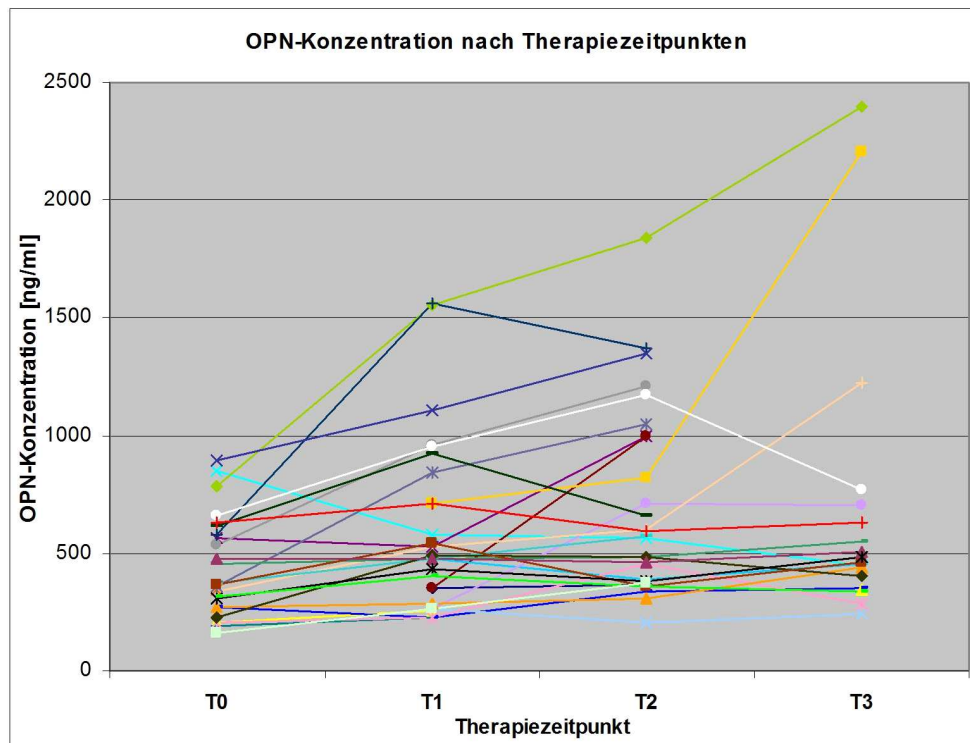


Abb. 9 - Graphische Darstellung der OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf für die einzelnen Patienten. Es zeigt sich eine von Abnahmezeitpunkt zu Abnahmezeitpunkt zunehmende Streuung bei insgesamt steigenden OPN-Werten. Es wird deutlich, dass vor allem bei Patienten mit sehr hoher OPN-Konzentration die T3-Probe fehlt.

#### 4.1.2 OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf abhängig vom Operationsverfahren

Bei den 16 Patienten, die eine makroskopische Tumortotalresektion erhalten haben, betrug die mittlere OPN-Konzentration zum Abnahmezeitpunkt T0 420, zu T1 486, zu T2 575 und zu T3 501 ng/ml. Bei den 17 Patienten mit weniger radikaler Operation waren es zu T0 505, zu T1 692, zu T2 858 und zu T3 1033 ng/ml.

Signifikanz erreicht dabei nur der Konzentrationsunterschied zwischen T0 und T2 in der Patientengruppe mit weniger radikaler Operation ( $p = 0.03$ ), bei den Patienten mit Totalresektion zeigt sich zwischen T0 und T2 ein schwacher Trend ( $p = 0.1$ ). Zu den Zeitpunkten T2 und T3 zeigt zudem der OPN-Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Patientengruppen einen Trend zur Signifikanz ( $p = 0.07$  bzw.  $p = 0.1$ ).

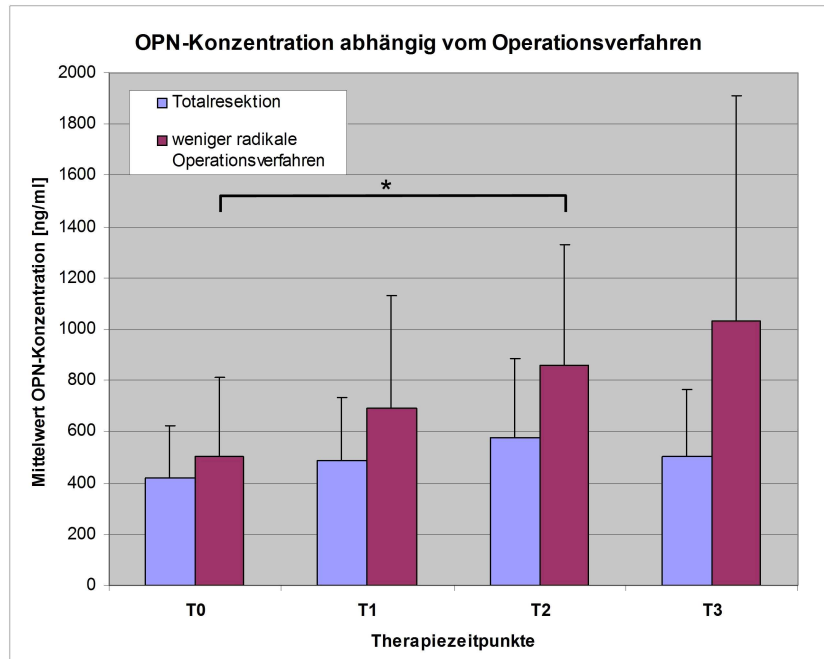


Abb.10 - Graphische Darstellung der OPN-Plasmakonzentration in Abhängigkeit von der Radikalität der Tumoroperation. Es zeigt sich im Therapieverlauf bei Patienten mit weniger radikaler Operation ein deutlich stärkerer Anstieg der OPN-Konzentration. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

#### 4.1.3 OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf abhängig von der Bestrahlungsdosis

Ich habe zu den vier Abnahmezeitpunkten die mittlere OPN-Konzentration bei den 11 Patienten mit einer Bestrahlungsdosis bis 54 Gy und bei den 20 Patienten mit einer Dosis ab 58 Gy verglichen. Es ergeben sich für die Niedrig- bzw. die Hochdosisgruppe folgende Werte: Zum Zeitpunkt T0 533 bzw. 381 ng/ml (Trend,  $p = 0.08$ ), T1 616 bzw. 451 ng/ml ( $p = 0.03$ ), T2 1009 bzw. 548 ng/ml ( $p = 0.02$ ). Zum Zeitpunkt T3 ist ein Vergleich nicht mehr möglich, weil in der Niedrigdosisgruppe nur noch für drei Patienten OPN-Werte vorhanden sind.

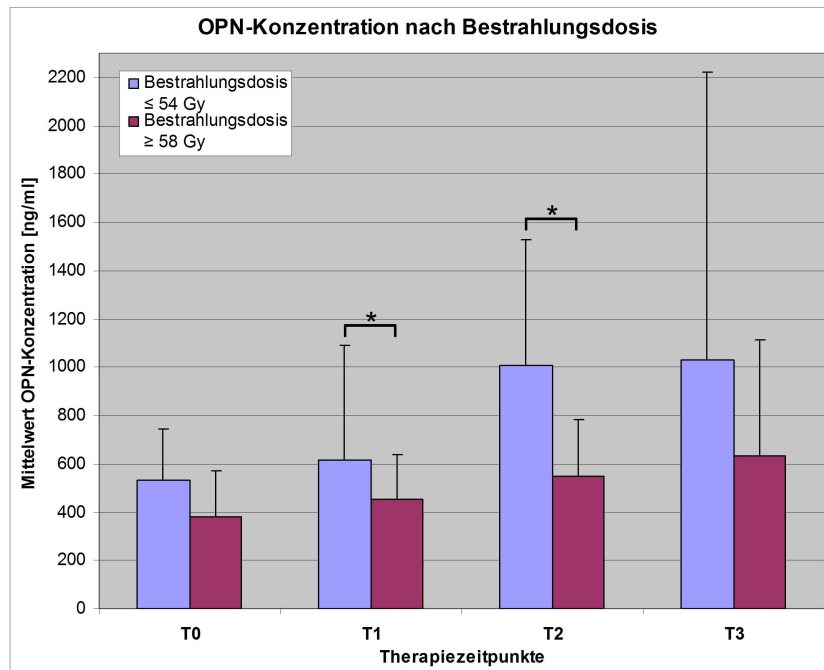


Abb.11 - Graphische Darstellung der OPN-Konzentration in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Es zeigt sich zu allen Abnahmezeitpunkten, also auch schon vor Bestrahlungsbeginn, eine höhere OPN-Konzentration bei Patienten mit niedriger Bestrahlungsdosis. Dies ist zu T1 und T2 signifikant. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

#### 4.2 OPN-Plasmakonzentration abhängig vom WHO-Grad

Vergleicht man den mittleren OPN-Spiegel zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten bei den 12 Patienten mit einem anaplastischen Astrozytom oder Oligodendrogliom (WHO °III) mit dem bei den 21 Glioblastompatienten (WHO °IV), so ergeben sich folgende Werte: Zu T0 384 ng/ml bei anaplastischem Gliom bzw. 518 ng/ml bei Glioblastom (Trend,  $p = 0.11$ ), zu T1 480 bzw. 641 ng/ml (Trend,  $p = 0.08$ ), zu T2 622 bzw. 732 (nicht signifikant) und zu T3 638 bzw. 763 ng/ml (nicht signifikant).

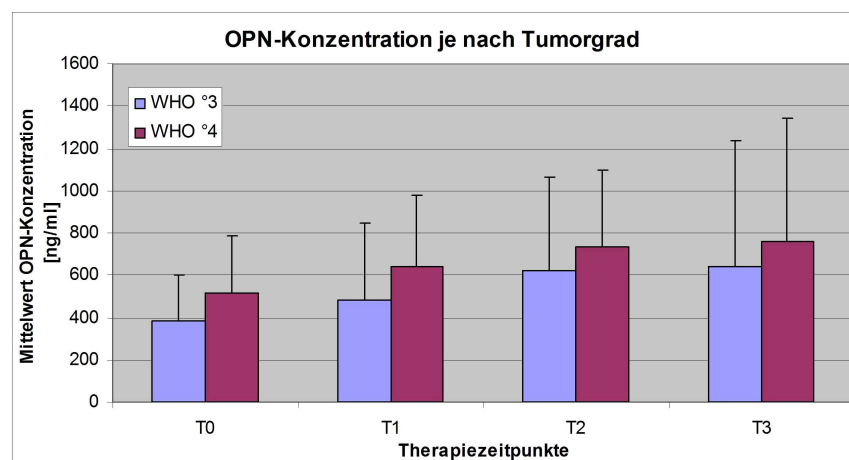


Abb.12 – Graphische Darstellung der OPN-Plasmakonzentration in Abhängigkeit vom Tumorgrad. Zu allen Therapiezeitpunkten zeigt sich eine tendenziell höhere OPN-Konzentration bei Glioblastomen, mit einem Trend zur Signifikanz zu T0 und T1. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.



### 4.3 OPN-Plasmakonzentration abhängig von den vermessenen Volumina

Alle drei Volumenparameter, absolutes Nekrose-, absolutes Tumor- und relatives Nekrosevolumen, wurden mit der OPN-Plasmakonzentration ins Verhältnis gesetzt.

#### 4.3.1 Absolutes Nekrosevolumen

Trägt man das absolute Nekrosevolumen gegen die OPN-Plasmakonzentration zu den Abnahmezeitpunkten T0, T1 und T2 auf, so ergeben sich die Abbildungen 13A-C. Zum Zeitpunkt T3 ist wegen der dort sehr lückenhaften Daten eine sinnvolle Bewertung unmöglich. Zu allen dargestellten Zeitpunkten erkennt man eine tendenzielle Zunahme der OPN-Konzentration mit steigendem Nekrosevolumen, am deutlichsten zu T1.

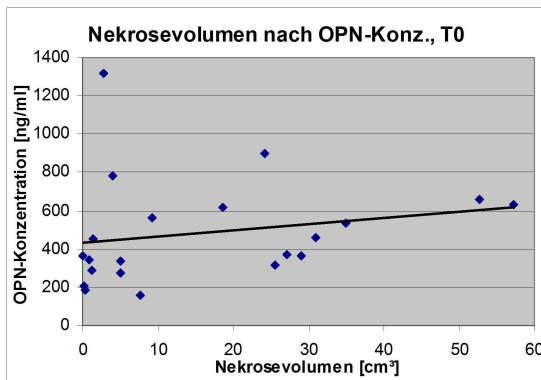


Abb.13A

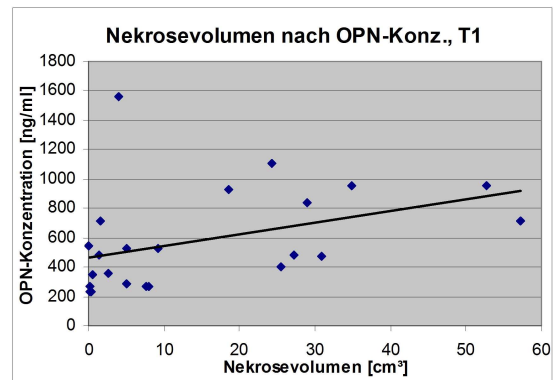


Abb.13B

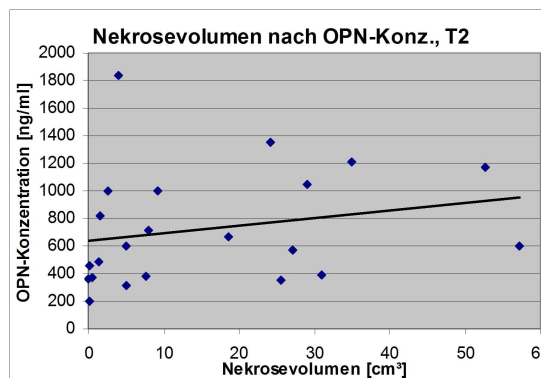


Abb.13C

Abb.13A-C - Graphische Darstellung der OPN-Plasmakonzentration in Abhängigkeit vom absoluten Nekrosevolumen für die Abnahmezeitpunkte T0, T1 und T2. Es zeigt sich jeweils eine tendenzielle Zunahme der OPN-Konzentration mit zunehmendem Nekrosevolumen, am deutlichsten zu T1.

Bildet man nun zwei Patientengruppen mit einem absoluten Nekrosevolumen, das entweder kleiner oder größer als der Median von 5,05 cm<sup>3</sup> ist, so zeigt sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikant unterschiedliche OPN-Plasmakonzentration in den Gruppen.

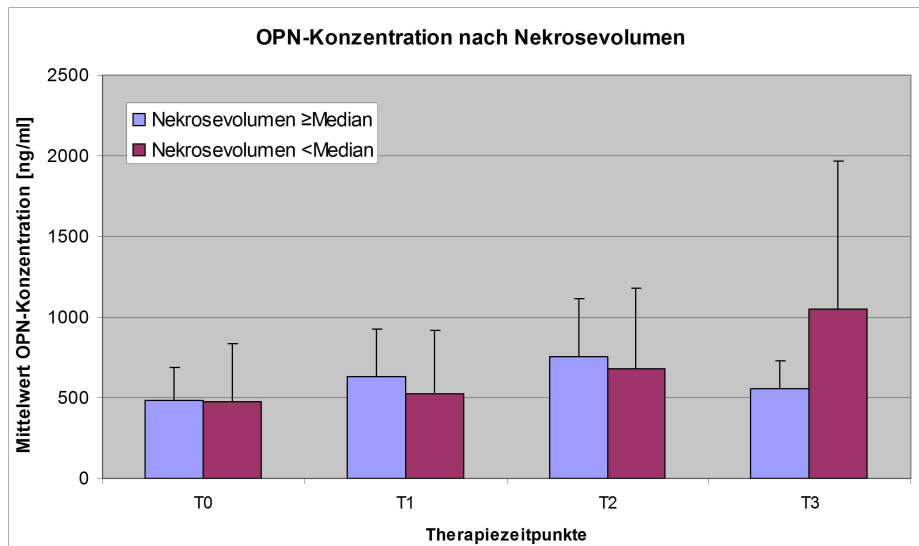


Abb.14 – Graphische Darstellung der OPN-Plasmakonzentration in Abhängigkeit vom absoluten Nekrosevolumen. Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Bei umgekehrter Betrachtung ergibt sich jedoch ein anderes Bild. Ich ordnete die Patienten zu jedem Abnahmezeitpunkt nach ihrer OPN-Plasmakonzentration und bildete jeweils zwei Gruppen mit einer OPN-Konzentration, die kleiner oder größer ist als die mediane OPN-Konzentration zu diesem Zeitpunkt. Zumindest zu T0 ist das mittlere Nekrosevolumen in der Gruppe mit der hohen OPN-Plasmakonzentration signifikant größer (23.9 cm<sup>3</sup> bei hohem, 7.5 cm<sup>3</sup> bei niedrigem OPN;  $p = 0.02$ ). Auch zu den anderen Abnahmezeitpunkten ist das mittlere Nekrosevolumen in der Gruppe mit der hohen OPN-Plasmakonzentration stets größer, allerdings nicht signifikant.

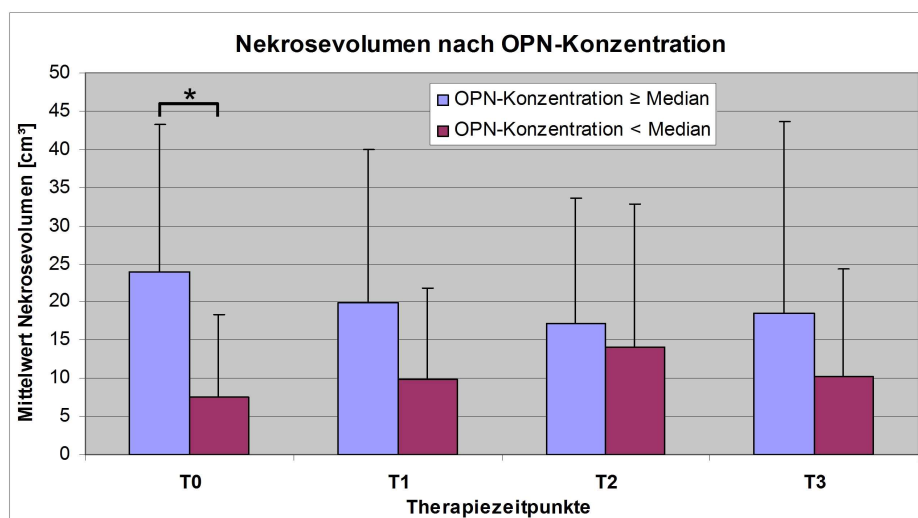


Abb.15 - Graphische Darstellung des absoluten Nekrosevolumens in Abhängigkeit von der OPN-Plasmakonzentration. Zu allen Abnahmezeitpunkten zeigt sich eine erhöhte OPN-Konzentration bei großem absolutem Nekrosevolumen. Dies ist zu T0 signifikant. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 4.3.2 Absolutes Tumolvolumen

Insgesamt etwas besser ist die Korrelation des absoluten Tumolvolumens mit der OPN-Konzentration. Dies zeigt sich deutlicher in den nach den Medianen von Tumolvolumen und OPN-Plasmakonzentration definierten Gruppen, weniger bei der Betrachtung als Punktwolke (siehe Abbildung 16A-C). Zu allen dargestellten Zeitpunkten zeigt sich dort tendenziell eine mit zunehmendem Tumolvolumen steigende OPN-Konzentration. Der Zusammenhang erscheint eher schwach, am deutlichsten wird er zu T1.

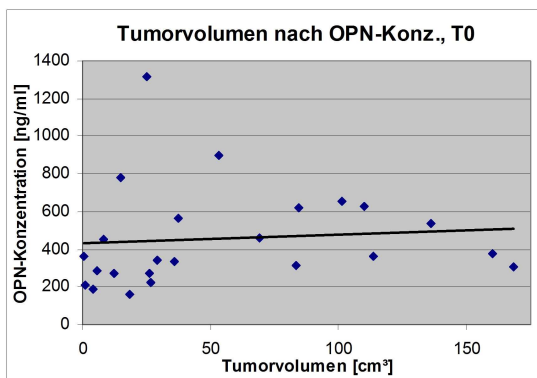


Abb.16A

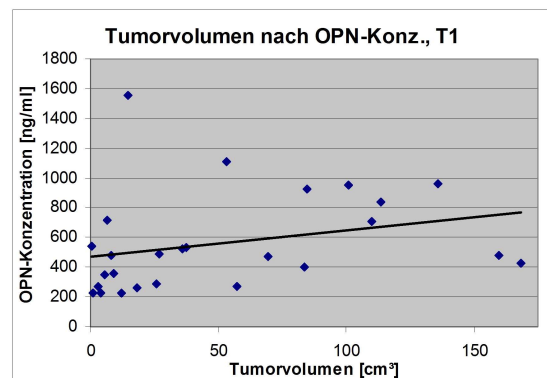


Abb.16B

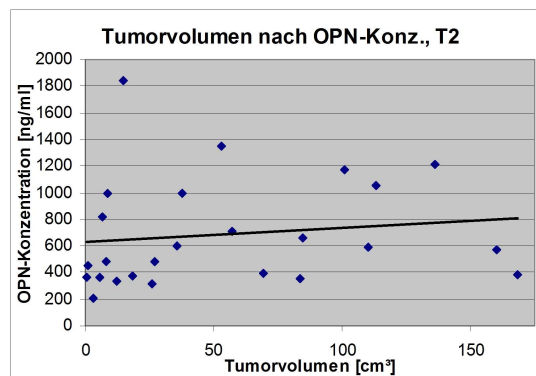


Abb.16C

Abb.16A-C - Graphische Darstellung der OPN-Plasmakonzentration in Abhängigkeit vom absoluten Tumolvolumen für die Abnahmezeitpunkte T0, T1 und T2. Es zeigt sich jeweils eine tendenzielle Zunahme der OPN-Konzentration mit zunehmendem Nekrosevolumen, am deutlichsten zu T1. Insgesamt erscheint der Zusammenhang aber eher schwach.

Ordnet man die Patienten nach der Größe ihres absoluten Tumolvolumens, bildet zwei Gruppen mit einem kleineren oder größeren Tumolvolumen als der Median ( $26.8 \text{ cm}^3$ ), und vergleicht zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten die OPN-Konzentration in den beiden Gruppen, so ergibt sich folgendes Bild: Zum Zeitpunkt T1 zeigen sich OPN-Konzentrationen von 650 bzw. 458 ng/ml ( $p = 0.02$ ) und zum Zeitpunkt T2 von 753 bzw. 596 ng/ml (Trend,  $p = 0.06$ ) in den Gruppen mit großem bzw. kleinem Tumolvolumen. Zu T0 und T3 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

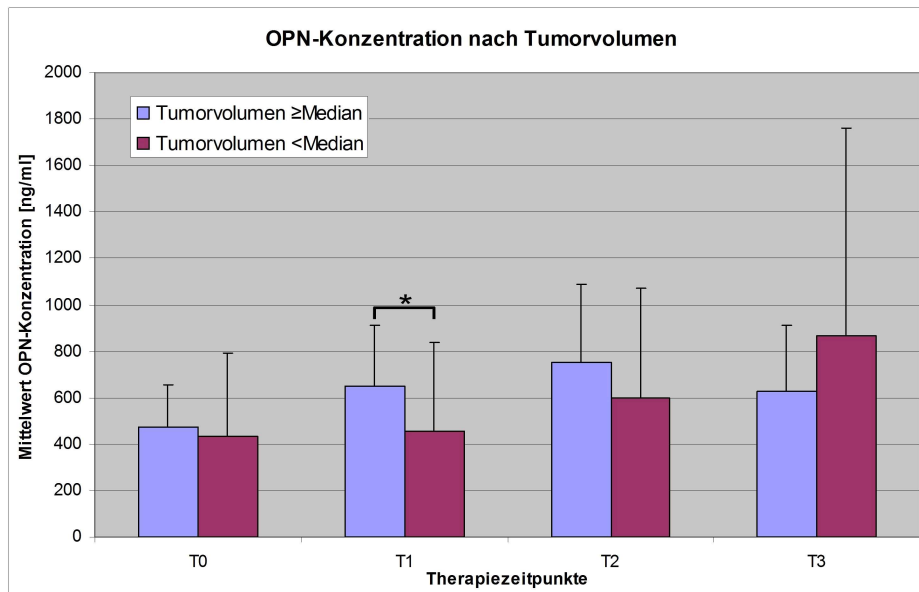


Abb.17 - Graphische Darstellung der OPN-Konzentration in Abhängigkeit vom absoluten Tumolvolumen. Außer zu T3 zeigt sich eine höhere OPN-Konzentration bei größerem absolutem Tumolvolumen. Dies ist zu T1 signifikant und zeigt zu T2 einen Trend zur Signifikanz. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Bei umgekehrter Betrachtung zeigt sich zum Zeitpunkt T2 ein signifikant größeres mittleres Tumolvolumen bei hoher als bei niedriger OPN-Plasmakonzentration (70.7 bzw. 35.2 cm<sup>3</sup>; p = 0.04). Auch zu den anderen Abnahmezeitpunkten ist das mittlere Tumolvolumen bei hoher OPN-Konzentration größer, jedoch nicht signifikant.

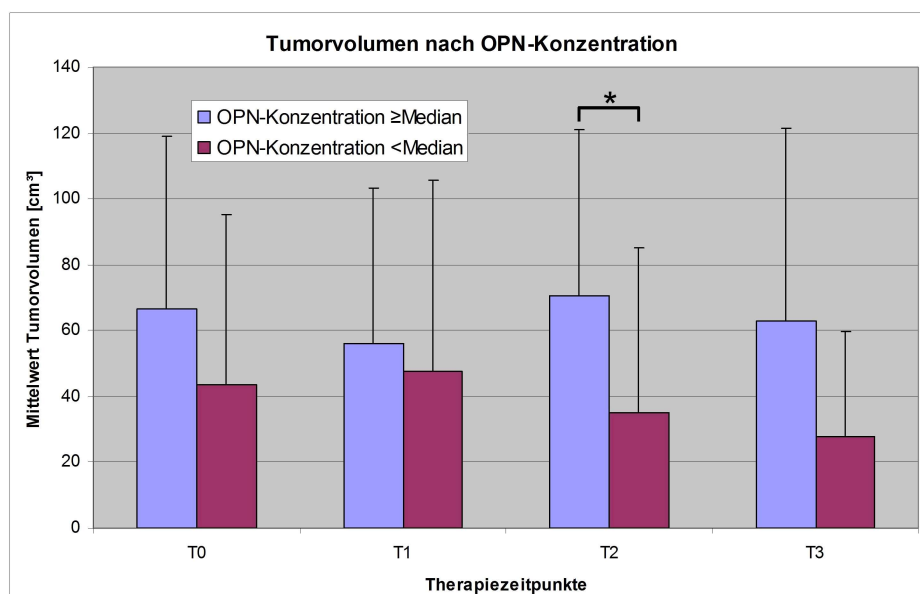


Abb. 18 - Graphische Darstellung des absoluten Tumolvolumens in Abhängigkeit von der OPN-Konzentration. Es zeigt sich zu allen Abnahmezeitpunkten ein größeres absolutes Tumolvolumen bei höherer OPN-Konzentration. Dies ist zu T2 signifikant. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

### 4.3.3 Relatives Nekrosevolumen

Insgesamt am besten ist die Korrelation des relativen Nekrosevolumens mit der OPN-Plasmakonzentration zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten. Die Darstellung als Punktwolke ergibt zu T0, T1 und T2 die Abbildungen 19A-C. Der zu beobachtende Zusammenhang zwischen hoher OPN-Konzentration und hohem relativen Nekrosevolumen erscheint deutlicher als bei den anderen beiden bereits erörterten Volumenparametern.

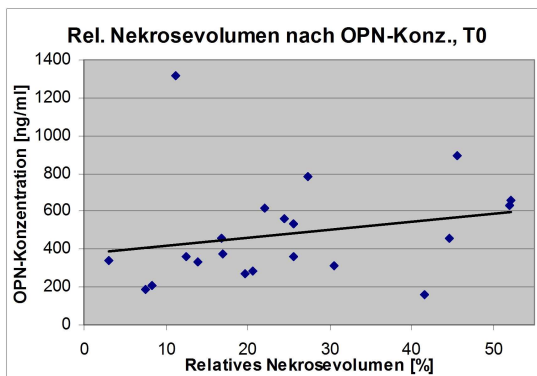


Abb.19A

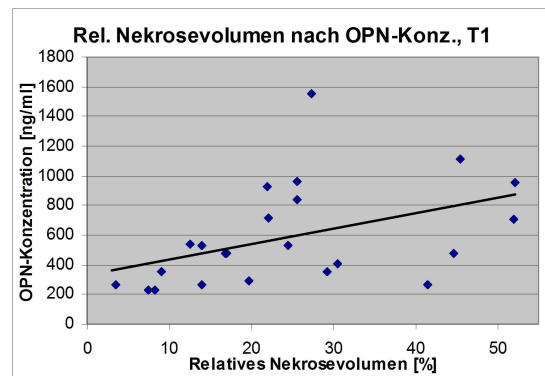


Abb.19B

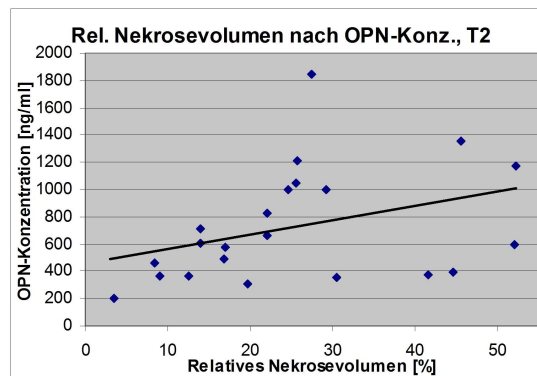


Abb.19C

Abb.19A-C - Graphische Darstellung der OPN-Plasmakonzentration in Abhängigkeit vom relativen Nekrosevolumen zu den Abnahmezeitpunkten T0, T1 und T2. Es zeigt sich eine tendenzielle Zunahme der OPN-Konzentration mit zunehmendem relativem Nekrosevolumen. Die Korrelation erscheint deutlicher als bei den anderen beiden Volumenparametern.

Bildet man wieder zwei Patientengruppen mit einem relativen Nekrosevolumen, das größer oder kleiner ist als der Median (21.35%), so zeigt sich eine sehr enge Korrelation mit den OPN-Konzentrationen zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten. In den Gruppen mit großem bzw. kleinem relativem Nekrosevolumen ergeben sich zum Zeitpunkt T0 mittlere OPN-Konzentrationen von 543 bzw. 415 ng/ml (Trend,  $p = 0.06$ ), zu T1 von 753 bzw. 366 ng/ml ( $p = 0.005$ ), zu T2 von 910 bzw. 453 ng/ml ( $p = 0.009$ ) und zu T3 von 1133 bzw. 558 ng/ml (nicht signifikant).

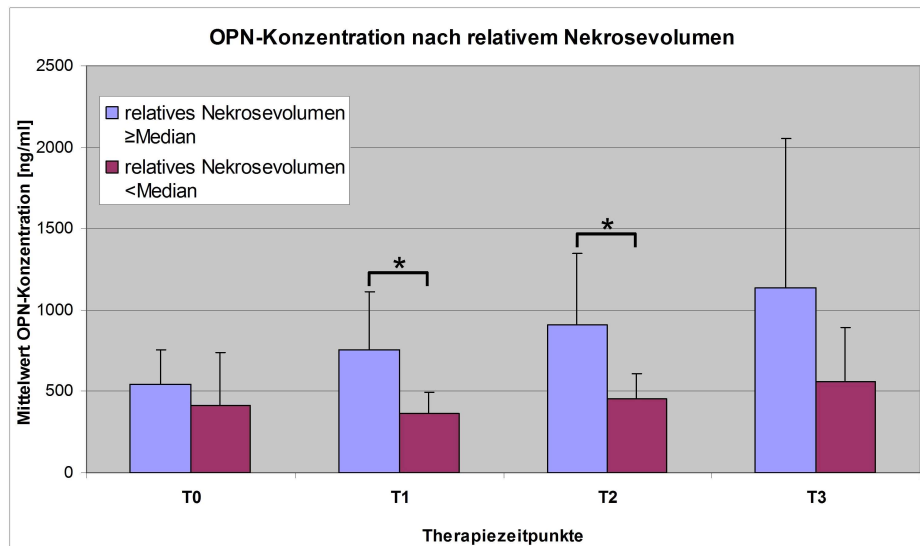


Abb.20 - Graphische Darstellung der OPN-Konzentration in Abhängigkeit vom relativen Nekrosevolumen. Es besteht eine enge positive Korrelation der beiden Parameter. Dies ist zu T1 und T2 signifikant und zeigt zu T0 einen Trend zur Signifikanz. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

Das Ergebnis der umgekehrten Betrachtung ist weniger deutlich. Es ergibt sich zwar ebenfalls zu jedem Zeitpunkt ein größeres relatives Nekrosevolumen bei hoher als bei niedriger OPN-Konzentration, dies zeigt allerdings nur zu T0 einen starken Trend zur Signifikanz (30.8 bzw. 18.3 %; Trend,  $p = 0.051$ ).

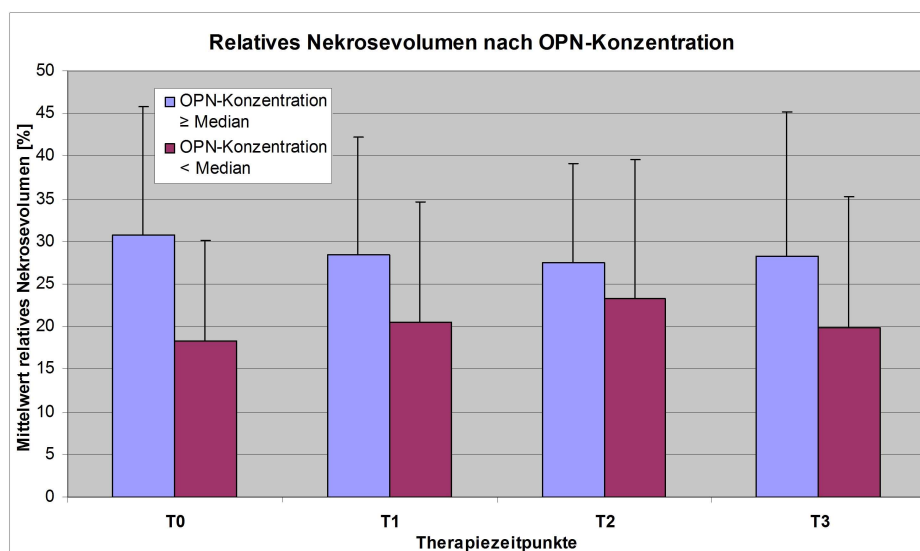


Abb. 21 - Graphische Darstellung des relativen Nekrosevolumens in Abhängigkeit von der OPN-Plasmakonzentration. Es zeigt sich zu allen Abnahmezeitpunkten ein größeres relatives Nekrosevolumen bei höherer OPN-Konzentration mit einem deutlichen Trend zur Signifikanz bei T0. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung.

## 4.4 Ergebnisse zur Gesamtüberlebenszeit

### 4.4.1 Gesamtüberlebenszeit abhängig von der OPN-Plasmakonzentration, Gesamtkollektiv

Zu allen Abnahmezeitpunkten wurden jeweils zwei Patientengruppen gebildet mit größerer oder kleinerer OPN-Plasmakonzentration als der Median zum entsprechenden Zeitpunkt. In der Kaplan-Meyer-Analyse ergab sich zu allen Zeitpunkten bei niedriger OPN-Konzentration eine längere mediane Überlebenszeit als bei hoher. Dies war zu T2 signifikant, mit 567 Tagen bei niedriger und 220 Tagen bei hoher OPN-Konzentration ( $p = 0.02$ ).

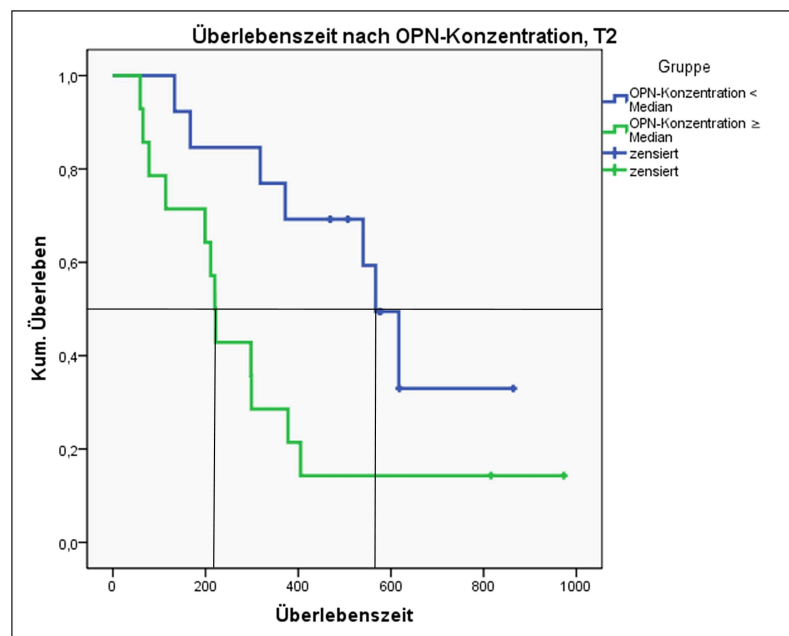


Abb.22 - Graphische Darstellung der individuellen Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit von der OPN-Plasmakonzentration zum Abnahmezeitpunkt T2 als Kaplan-Meyer-Kurve. Die medianen Überlebenszeiten sind eingezeichnet. Der deutlich erkennbare Überlebensvorteil bei niedriger OPN-Konzentration ist signifikant.

Um den Einfluss des Anstiegs der OPN-Konzentration von einem früheren zu einem späteren Abnahmezeitpunkt auf die Überlebenszeit zu untersuchen, wurden wiederum jeweils zwei Patientengruppen gebildet: Patienten mit einem kleineren oder größeren als dem medianen OPN-Konzentrationsanstieg zwischen den gerade betrachteten Abnahmezeitpunkten.

Es zeigte sich, dass bei Patienten mit einem geringen OPN-Anstieg von T0 zu T2 eine mediane Überlebenszeit in der Kaplan-Meyer-Analyse nicht angegeben werden kann, weil zum Studienende in dieser Gruppe noch mehr als 50 % der nicht-zensierten

Patienten am Leben waren. Bei Patienten mit einem starken OPN-Anstieg in diesem Zeitraum betrug die mediane Überlebenszeit nur 211 Tage. Es ergab sich ein signifikanter Überlebensvorteil ( $p = 0.006$ ). Auch für den OPN-Anstieg von T1 zu T2 zeigt sich eine entsprechende Tendenz. Patienten mit einem schwachen bzw. starken Anstieg überlebten im Median 617 bzw. 220 Tage ( $p = 0.02$ ).

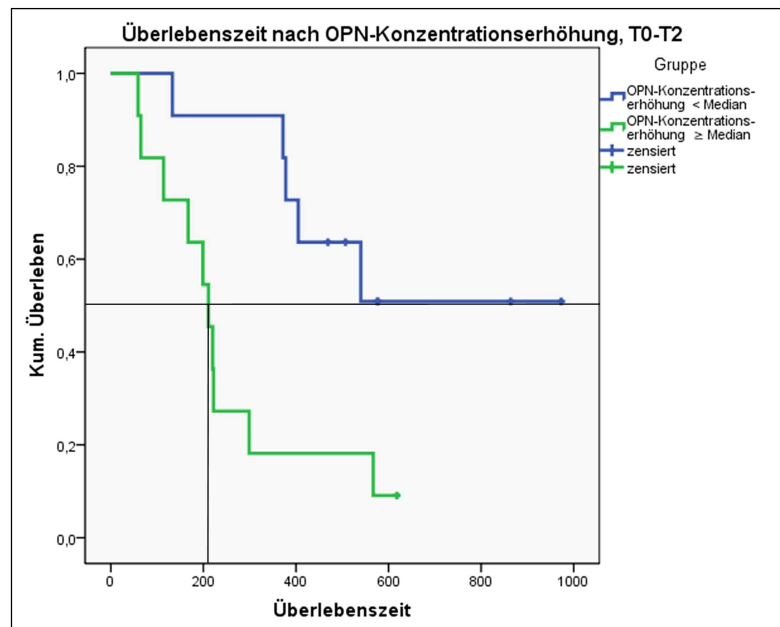


Abb.23 - Graphische Darstellung der individuellen Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit vom OPN-Plasmakonzentrationsanstieg zwischen den Abnahmezeitpunkten T0 und T2 als Kaplan-Meier-Kurve. Die mediane Überlebenszeit in der Patientengruppe mit starkem Anstieg ist eingezeichnet. Der deutliche Überlebensvorteil bei geringem Anstieg ist signifikant.

#### 4.4.2 Gesamtüberlebenszeit abhängig von bekannten Risikofaktoren (Resektionsausmaß, Lebensalter und Tumorstadium)

Patienten, bei denen eine makroskopische Tumortotalresektion vorgenommen worden war, überlebten im Median nach der Kaplan-Meier-Analyse 378 Tage, solche mit weniger radikaler Operation nur 199 Tage (nicht signifikant).

Patienten, die beim Studieneinschluss so alt oder älter wie der Median waren (63 Jahre) überlebten im Median 199 Tage, jüngere Patienten dagegen 689 Tage ( $p = 0.003$ ).

Patienten mit der histologischen Diagnose Glioblastom überlebten im Median 220 Tage, Patienten mit einem anaplastischen Astrozytom oder anaplastischen Oligodendrogliom 689 Tage ( $p = 0.001$ ).



#### **4.4.3 Gesamtüberlebenszeit abhängig von der OPN-Plasmakonzentration in nach Risikofaktoren definierten Untergruppen**

##### 1. Untergruppen nach dem Resektionsausmaß:

Betrachtet man in der Kaplan-Meyer-Analyse nur die 16 Patienten, die eine makroskopische Tumortotalresektion erhalten haben, so überlebten solche Patienten, die zum Zeitpunkt T0 eine größere als die mediane OPN-Konzentration (335.13 ng/ml) hatten, im Median 222 Tage. Bei solchen mit einer niedrigeren OPN-Konzentration lässt sich keine mediane Überlebenszeit angeben, weil zum Studienende noch mehr als 50 % der Patienten lebten. Dieser Überlebensvorteil ist signifikant ( $p=0.04$ ).

Betrachtet man hingegen nur die 17 Patienten, die mit einer weniger radikalen Operation behandelt worden sind, so betrug die mediane Überlebenszeit von Patienten, die zum Zeitpunkt T2 eine höhere als die mediane OPN-Konzentration (822,60 ng/ml) hatten, 199 Tage, in der Gruppe mit niedrigerer OPN-Konzentration 617 Tage ( $p = 0.02$ ). Ebenfalls signifikant ist der entsprechende Zusammenhang zu T3, trotz der zu diesem Zeitpunkt sehr geringen Datenbasis. Patienten mit einer höheren als der medianen OPN-Konzentration von 553.33 ng/ml überlebten im Median 298 Tage, solche mit niedrigerer OPN-Konzentration 689 Tage ( $p = 0.02$ ).

##### 2. Untergruppen nach dem Lebensalter:

Auch bei isolierter Betrachtung älterer und jüngerer Patienten zeigt sich zu bestimmten Abnahmezeitpunkten ein entsprechender Trend. Die 15 Patienten, die bei Studieneinschluss jünger waren als der Median (63 Jahre), überlebten bei zum Zeitpunkt T2 höherer als der medianen OPN-Konzentration (486.49 ng/ml) im Median 405 Tage. Bei Patienten mit niedrigerer OPN-Konzentration lässt sich wiederum keine mediane Überlebenszeit angeben, weil zum Studienende noch mehr als die Hälfte der Patienten am Leben war (Trend,  $p = 0.08$ ).

Bei den 18 älteren Patienten betrug die mediane Überlebenszeit bei zu T1 höherer als der medianen OPN-Konzentration (525.03 ng/ml) 199 Tage, bei niedrigerer OPN-Konzentration 318 Tage (Trend,  $p < 0.1$ ).

### 3. Untergruppen nach dem Tumorstadium:

Bei ausschließlicher Betrachtung der 21 Glioblastompatienten zeigt sich zu T2 ein signifikanter Unterschied. Patienten mit höherer als der medianen OPN-Konzentration (632.96 ng/ml) überlebten im Median 211 Tage, solche mit niedrigerer OPN-Konzentration 372 Tage ( $p = 0.02$ ).

Die Untergruppe der 12 Patienten mit WHO-Grad-III-Gliom bildet eine Ausnahme. Zwar zeigt sich auch hier zu keinem Abnahmezeitpunkt ein Überlebensvorteil bei hoher OPN-Konzentration, es ergibt sich aber zu keinem Zeitpunkt ein Trend zur Signifikanz.

Tab.3: Übersicht über die mediane Überlebenszeit der verschiedenen nach bekannten Risikofaktoren gebildeten Subgruppen in Abhängigkeit von der OPN-Konzentration zu den vier Abnahmezeitpunkten. \* bedeutet einen statistischen Trend ( $p < 0.1$ ), \*\* einen signifikanten Zusammenhang ( $p < 0.05$ ).

	Mediane Überlebenszeit in Tagen nach Kaplan-Meyer-Analyse abhängig von der OPN-Konzentration zum Zeitpunkt:			
	T0	T1	T2	T3
Patienten mit Totalresektion, OPN-Konzentration $\geq$ der Median	222**	222	222	405
Patienten mit Totalresektion, OPN-Konzentration $<$ der Median	>50% lebend**	567	567	567
Patienten mit weniger radikaler OP, OPN-Konzentration $\geq$ der Median	211	211	199**	298**
Patienten mit weniger radikaler OP, OPN-Konzentration $<$ der Median	142	540	617**	689**
Patienten $<$ 58. LJ, OPN-Konzentration $\geq$ der Median	540	540	405*	540
Patienten $<$ 58. LJ, OPN-Konzentration $<$ der Median	689	689	>50% lebend*	>50% lebend
Patienten $\geq$ 63. LJ, OPN-Konzentration $\geq$ der Median	199	199*	199	222
Patienten $\geq$ 63. LJ OPN-Konzentration $<$ der Median	142	318*	318	318
Patienten mit Glioblastom, OPN-Konzentration $\geq$ der Median	220	220	211**	299
Patienten mit Glioblastom, OPN-Konzentration $<$ der Median	222	318	372**	318
Patienten mit WHO $\circ$ 3-Gliom, OPN-Konzentration $\geq$ der Median	>50% lebend	>50% lebend	>50% lebend	>50% lebend
Patienten mit WHO $\circ$ 3-Gliom, OPN-Konzentration $<$ der Median	689	689	>50% lebend	>50% lebend

#### 4.4.4 Gesamtüberlebenszeit abhängig vom relativen Nekrosevolumen

Auch das relative Nekrosevolumen zeigte eine Korrelation mit der Gesamtüberlebenszeit.

Es wurden zwei Patientengruppen gebildet mit einem relativen Nekrosevolumen, das größer oder kleiner ist als der Median (22%). Es zeigte sich, dass Patienten mit einem großen bzw. kleinen relativen Nekrosevolumen im Median 199 Tage bzw. 318 Tage (Trend,  $p = 0.09$ ) überlebten.

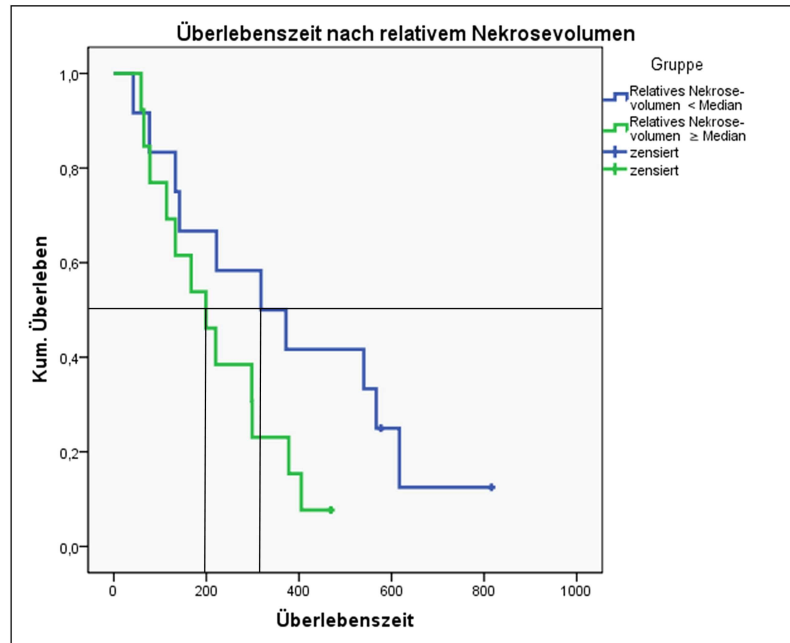


Abb.24 - Graphische Darstellung der individuellen Gesamtüberlebenszeit in Abhängigkeit vom relativen Nekrosevolumen als Kaplan-Meier-Kurve. Die mediane Überlebenszeit in den beiden Patientengruppen ist eingezeichnet. Der erkennbare Überlebensvorteil bei kleinem relativem Nekrosevolumen zeigt einen Trend zur Signifikanz.

## 5. Diskussion

### 5.1 Veränderung der OPN-Plasmakonzentration im Therapieverlauf

Sollte entsprechend der These bei Patienten mit malignen Gliomen eine tumorassoziierte Erhöhung der OPN-Plasmakonzentration vorliegen, so wäre ein deutlicher Abfall der OPN-Konzentration im Therapieverlauf zu erwarten, denn das Tumorgewebe als angenommene Quelle des zusätzlich sezernierten OPN wird im Rahmen der Therapie reduziert. Besonders stark sollte dieser Konzentrationsabfall zwischen den Abnahmezeitpunkten T0 und T1 sein, da in dieser Zeit bei einem Großteil der Studienpatienten eine totale oder subtotale Tumoresektion stattgefunden hat.

Die Bestimmung der OPN-Plasmakonzentration zu den vier Abnahmezeitpunkten führte jedoch zu der Beobachtung, dass der OPN-Spiegel offenbar von Abnahmezeitpunkt zu Abnahmezeitpunkt kontinuierlich ansteigt. Auch wenn dieser Anstieg oft nicht signifikant ist, ergibt sich doch zumindest keinerlei Hinweis auf den

eigentlich erwarteten therapiebedingten Abfall der OPN-Konzentration. Gerade von T0 zu T1 bzw. T2, also von der prä- zu den ersten beiden postoperativen Blutabnahmen, war ein signifikanter OPN-Konzentrationsanstieg zu beobachten. Diese Beobachtung könnte durch verschiedene Faktoren bedingt sein, die im Folgenden erläutert werden.

### **5.1.1 Einfluss des Operationsverfahrens**

Ein nahe liegender Gedanke wäre, dass es nach makroskopischer Tumortotalresektion tatsächlich zu einem OPN-Plasmakonzentrationsabfall kommt, wie es z.B. von Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen bekannt ist (*Blasberg et al., 2010*). Dies könnte aber in meinen Daten nicht sichtbar sein, weil bei der Hälfte der Patienten nur eine Teilresektion oder eine Biopsie erfolgt war. Bei diesen Patienten ist makroskopisch sichtbares, vitales Tumorgewebe in situ verblieben und könnte weiterhin OPN ins Plasma sezernieren.

Tatsächlich zeigte sich bei der Patientengruppe mit weniger radikaler Operation im Therapieverlauf ein stärker ausgeprägter Anstieg der OPN-Konzentration. Bei den Patienten mit einer Tumortotalresektion scheint die OPN-Konzentration von T2 zu T3 sogar wieder leicht zu sinken, ohne dass dies jedoch Signifikanzniveau erreichen würde. Der OPN-Konzentrationsunterschied zwischen beiden Patientengruppen ist zu keinem Abnahmezeitpunkt signifikant, zeigt aber bei T2 und T3 einen Trend zur Signifikanz.

Der relativ große Anteil an Patienten ohne Tumortotalresektion könnte somit teilweise erklären, warum die OPN-Plasmakonzentration im Gesamtkollektiv meiner Patienten im Therapieverlauf weiter ansteigt. Allerdings stellt sich auch bei den Patienten, die eine Totalresektion erhalten haben, der erwartete, deutliche postoperative Abfall der OPN-Konzentration nicht ein. Zudem könnten die Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen auch dadurch bedingt sein, dass bevorzugt Patienten im stabilen Allgemeinzustand mit radikaleren Verfahren operiert wurden, was unspezifisch ebenfalls zu einer niedrigeren OPN-Konzentration beitragen könnte.

### **5.1.2 Einfluss nicht-tumorassoziierter OPN-Sekretion**

Eine weitere mögliche Ursache des Phänomens wäre, dass das im Plasma gemessene OPN gar nicht aus dem Tumor selbst stammt, denn OPN ist ein eher unspezifischer Marker. Es wird von diversen Geweben und dem Immunsystem produziert (siehe 1.3.2)

und sogar eine steigende OPN-Plasmakonzentration mit zunehmendem Lebensalter ist teilweise nachgewiesen worden (*Takemoto et al., 1999*), was tendenziell, jedoch nicht signifikant auch bei meinen Patienten zu beobachten ist.

Meine weiteren Beobachtungen sprechen jedoch dafür, dass zumindest ein Teil des gemessenen OPN aus dem Bereich des Tumorgewebes stammen muss. Hinweise darauf sind beispielsweise der Zusammenhang der OPN-Plasmakonzentration mit den am Tumor vermessenen Volumenparametern und der Trend zu höherer OPN-Konzentration bei Glioblastompatienten im Vergleich zu Patienten mit WHO-Grad-III-Gliomen.

### **5.1.3 Einfluss erschwerter Diffusion**

Eine Grundannahme dieser Arbeit war, dass ein wesentlicher Teil des im Tumorgewebe sezernierten OPN aus hypoxischen Gewebsarealen stammt. Diese Areale sind aber gerade deshalb hypoxisch, weil sie schlecht durchblutet sind und deshalb die Diffusion von Sauerstoff aus dem Blut in diese Areale erschwert ist. Auch andere Substanzen, etwa Zytostatika, diffundieren schlechter aus dem Blut in hypoxische Gewebe (*Vaupel et al., 2001*). Ist aber die Diffusion in der einen Richtung behindert, könnte sie auch in der Gegenrichtung erschwert sein. Dies würde nicht nur OPN, sondern auch alle anderen endogenen Hypoxiemarker betreffen, weshalb es insgesamt interessant wäre, die Stoffdiffusion aus hypoxischem Gewebe ins Blut näher zu untersuchen.

Es könnte also, trotz lokal erhöhter OPN-Sekretion, der Einfluss hypoxischer Tumoreareale auf die OPN-Plasmakonzentration begrenzt sein. Wenn aber der Hauptanteil des im Plasma nachweisbaren, tumorassoziierten OPN gar nicht aus dem hypoxischen Tumorgewebe stammen würde, sondern z.B. aus anderen, im Folgenden erläuterten Quellen, wäre es auch nicht verwunderlich, wenn die Resektion dieses Gewebes nur einen geringen Einfluss auf die OPN-Plasmakonzentration hätte.

### **5.1.4 Einfluss postoperativ in situ verbleibender Tumorzellen**

Bedenkt man die biologische Eigenart maligner Gliome, über die makroskopischen Tumorgrenzen hinaus in gesund erscheinendes Gewebe hinein zu infiltrieren, ist es nicht überraschend, dass auch nach einer makroskopischen Totalresektion noch Tumorzellen in situ verbleiben, die weiterhin OPN sezernieren. Immunhistochemisch konnten maligne Zellen nachgewiesen werden, die noch weit entfernt von der

eigentlichen Gliommasse entlang physiologischer Faserbündel das Normalgewebe infiltrierten. Sogar historische Versuche, Glioblastompatienten durch eine Hemisphärektomie zu heilen, scheiterten, weil Tumorzellen regelmäßig bereits über Kommissurenbahnen die kontralaterale Hemisphäre infiltriert hatten (*Maria et al., 1993*). Wie groß die auf diese Weise postoperativ verbleibende Tumormasse ist, ist natürlich schwer abzuschätzen.

Von Karzinomen weiß man, dass OPN dort, entsprechend seiner physiologischen Funktionen, einerseits an der Grenze zu Nekrosezonen besonders stark exprimiert wird, aber andererseits auch entlang der Tumor-Stroma-Grenze, also dort, wo maligne Zellen gesundes Gewebe infiltrieren (*Brown et al., 1994*). Dies könnte auf maligne Gliome ebenso zutreffen, denn auch in diesen spielt OPN ja eine Rolle in der Vermittlung der Infiltration von Tumorzellen in das Normalgewebe (*Yan et al., 2010*).

In diesem Falle wären die postoperativ in situ verbleibenden, infiltrativen Tumorzellen gerade solche, die besonders intensiv OPN exprimieren und sezernieren. Da diese Tumorzellen zudem in ansonsten gesundem und damit gut durchblutetem Hirngewebe lokalisiert sind, könnte von ihnen sezerniertes OPN leicht ins Blutplasma gelangen. Diese Hypothese ließe sich tierexperimentell überprüfen durch eine Untersuchung der OPN-Expression im Tumorgewebe maligner Gliome, im unmittelbar angrenzenden Hirngewebe und in Hirngewebe gesunder Tiere.

Damit ließe sich relativ gut der fehlende postoperative Abfall der OPN-Plasmakonzentration erklären, weniger gut aber, warum diese so rasch weiter ansteigt.

### **5.1.5 Einfluss der Blut-Hirn-Schranke**

Die Blut-Hirn-Schranke wird von den Endothelzellen der zerebralen Blutgefäße unter Einfluss der Astrozyten gebildet und stellt insbesondere für polare Teilchen eine nur schwer permeable Barriere dar (*Persson, 2005*). OPN hat zahlreiche negativ geladene Seitengruppen, unter anderem viele Phosphatgruppen, und dürfte die intakte Blut-Hirn-Schranke schlecht überwinden. Bei 51 Multiple-Sklerose-Patienten betrug die mittlere OPN-Konzentration im Liquor 200 ng/ml, im Blutserum dagegen nur 43 ng/ml. Im Liquor, nicht aber im Serum war die OPN-Konzentration damit signifikant erhöht gegenüber 48 Patienten mit nicht-entzündlichen, neurologischen Erkrankungen (*Wen et al., 2011*). Übertragen auf maligne Gliome könnte das bedeuten, dass, trotz bereits

starker OPN-Expression und -Sekretion im Bereich des Tumors, vor Therapiebeginn die OPN-Plasmakonzentration niedrig bleibt.

Unter pathologischen Bedingungen, wie Entzündungen oder Traumata, wird die Blut-Hirn-Schranke jedoch durchlässig, es entsteht eine „Schrankenstörung“ (*Trepel, 2004*). Natürlich ist im Tumorgewebe auch präoperativ eine Schrankenstörung nicht auszuschließen, da dort ein chronisch-entzündliches Mikromilieu herrscht und die Blutgefäße atypisch und von schlechter Qualität sind. Im „gesunden“ Hirngewebe der unmittelbaren Umgebung dürfte die Blut-Hirn-Schranke dagegen relativ intakt sein.

Durch die Operation entsteht im Operationsgebiet, auch im Umgebungsparenchym, vermutlich eine ausgeprägte Schrankenstörung, zum einen durch Verletzung von Blutgefäßen, zum anderen durch den starken Entzündungsreiz. Die Schrankenstörung ist dabei wohl umso großflächiger, je radikaler die Operation durchgeführt wird. Infolgedessen könnte postoperativ, trotz verminderter absoluter OPN-Sekretion im verbleibenden Tumorgewebe, die OPN-Plasmakonzentration konstant bleiben oder sogar ansteigen. Weiterhin sezerniertes OPN, etwa aus den erwähnten infiltrativen Zellen im Umgebungsparenchym, kann nun besser ins Blut gelangen.

Dies könnte auch erklären, warum bei Bronchialkarzinomen tatsächlich ein postoperativer Abfall der OPN-Plasmakonzentration zu beobachten ist (*Blasberg et al., 2010*), nicht aber bei malignen Gliomen. Die OPN-Sekretion aus Bronchialkarzinomen wird präoperativ durch keine Permeabilitätsbarriere behindert.

Zur Erhärtung dieser Hypothese wäre eine Studie sinnvoll, in der der OPN-Spiegel von Patienten mit malignen Gliomen prä- und postoperativ zugleich im Blutplasma und im Liquor bestimmt wird. Mit massenspektrometrischen Verfahren konnte ein OPN-Fragment als eines von 4 aus über 2000 Peptiden identifiziert werden, deren Liquorkonzentration bei Glioblastompatienten gegenüber Gesunden signifikant erhöht ist (*Schuhmann et al., 2009*), womit eine wichtige Voraussetzung für eine solche Studie gegeben ist. Die Studie könnte helfen, den bestmöglichen Zeitpunkt zur Bestimmung von OPN bei malignen Gliomen zu ermitteln. Sollte tumorassoziiertes OPN tatsächlich präoperativ an der Blut-Hirn-Schranke aufgehalten werden, wäre es eventuell sinnvoller, den OPN-Plasmaspiegel erst postoperativ zu messen, was im Sinne einer frühen Therapieentscheidung ungünstig wäre. Alternativ könnte man die OPN-Bestimmung bei ZNS-Tumoren auch im Liquor vornehmen.

### 5.1.6 Einfluss der Bestrahlung

Die Bestrahlung könnte den postoperativen Wiederverschluss der Blut-Hirn-Schranke zusätzlich verzögern. In einem In-vitro-Modell der Blut-Hirn-Schranke konnte 72h nach Gammabestrahlung mit bis zu 4 Gy eine tagelang anhaltende Permeabilitätszunahme auch für großmolekulare Substanzen bis zu 70 kDa festgestellt werden, unter anderem aufgrund einer Öffnung endothelialer Tight-Junctions (*Fauquette et al., 2011*). Auch in vivo konnte eine Permeabilitätszunahme der Blut-Hirn-Schranke nach Bestrahlung gezeigt werden, etwa bei Ratten (*Rubin et al., 1994*). Somit könnte die Bestrahlung des Tumorgebietes postoperativ den Übertritt von OPN ins Blut begünstigen.

In diesem Falle wäre bei Patienten mit voller therapeutischer Bestrahlungsdosis tendenziell eine höhere OPN-Plasmakonzentration zu erwarten als bei Patienten mit reduzierter Dosis, insbesondere zum Zeitpunkt T2 am Ende der Bestrahlungsphase. Dies ist bei meinen Patienten nicht der Fall, im Gegenteil: Die OPN-Konzentration ist zu jedem Zeitpunkt in der Hochdosisgruppe deutlich niedriger als in der Niedrigdosisgruppe. Dies ist gerade zu T2 signifikant, außerdem auch zu T1.

Diese Korrelation ist aber kritisch zu betrachten. Ein Einfluss der Bestrahlungsdosis auf die OPN-Plasmakonzentration ist statistisch schwer nachzuweisen, da Patienten meist deshalb mit reduzierter Dosis bestrahlt werden, weil sie betagt oder in einem sehr schlechten Allgemeinzustand sind. Beides könnte unspezifisch zu einer höheren OPN-Konzentration beitragen und somit einen Zusammenhang zwischen niedriger Bestrahlungsdosis und hoher OPN-Konzentration vortäuschen. Insofern ist diese Beobachtung eher ein Hinweis auf den ohnehin zu erwartenden Zusammenhang zwischen OPN-Plasmakonzentration und Allgemeinzustand (siehe 5.1.2). Dafür spricht auch, dass die Korrelation schon zu T0, vor der Bestrahlung, besteht. Dies unterstreicht insgesamt die Validität meiner Daten, hilft aber bei der eigentlichen Fragestellung nicht weiter.

Überprüfen ließe sich diese Hypothese nur tierexperimentell, da dabei die Zuordnung zu den Bestrahlungsgruppen zufällig erfolgen könnte. Man könnte dabei die OPN-Plasmakonzentration bei manifestem malignem Gliom zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmen und zwar beispielsweise ohne Bestrahlung, bei niedriger und bei hoher Bestrahlungsdosis.



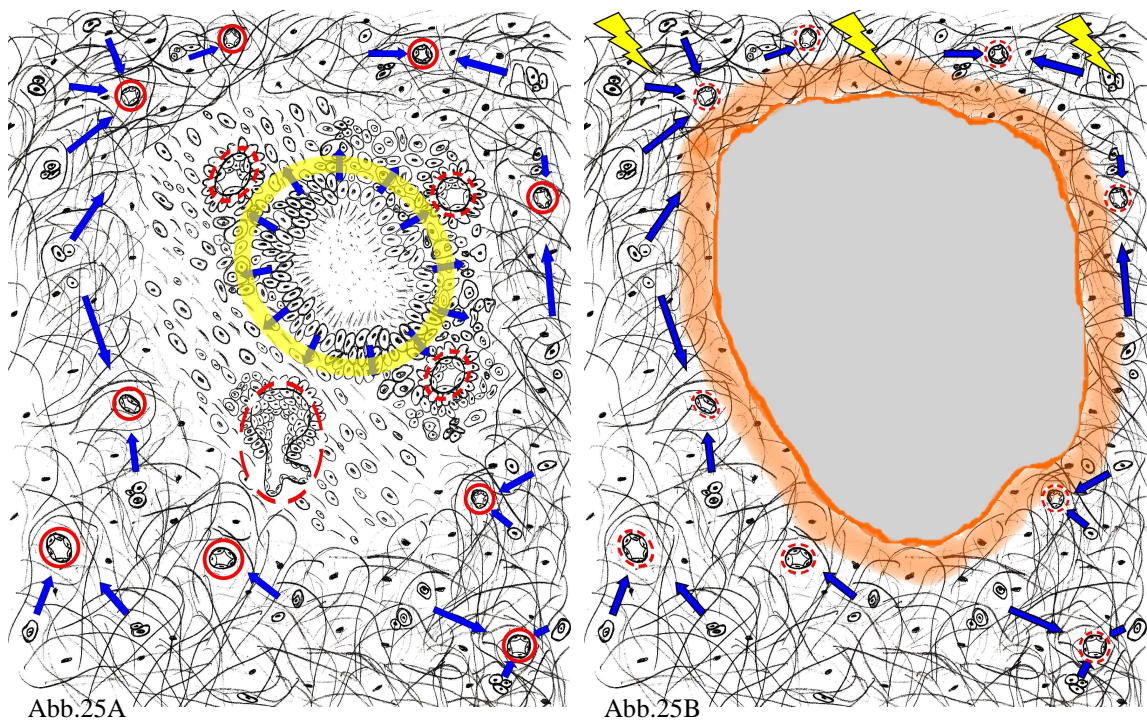


Abb.25A

Abb.25B

Abb.25A und B - Schematische Darstellung der möglichen Ursachen des fehlenden Abfalls der OPN-Plasmakonzentration nach Totalresektion des malignen Glioms. Blaue Pfeile symbolisieren die OPN-Sekretion durch Tumorzellen, rote Kreise die Blut-Hirn-Schranke.

Abbildung 25A zeigt den präoperativen Zustand. Man erkennt eine intensive OPN-Sekretion durch perinekrotische und infiltrative Tumorzellen. Ferner erkennt man die lecke Blut-Hirn-Schranke im Bereich der atypischen Tumorgefäße und die intakte Blut-Hirn-Schranke im Bereich des Hirnparenchyms. Der gelbe Kreis deutet die wegen der verlängerten Diffusionsstrecke erschwerte OPN-Diffusion aus der perinekrotischen Hypoxiezone ins Blut an.

Abbildung 25B zeigt den postoperativen Zustand. Die Operationswunde wirkt als starker Entzündungsreiz auf das Umgebungsparenchym. Dies wird zusätzlich verstärkt durch die als gelbe Blitze symbolisierte Bestrahlung. Beides bewirkt eine kapilläre Permeabilitätszunahme, die Blut-Hirn-Schranke wird leak. Gleichzeitig sezernieren die nicht resezierten, infiltrativen Tumorzellen im Hirnparenchym weiter OPN. (modifiziert nach Schlote et al., 1999)

## 5.2 Zusammenhang zwischen der OPN-Plasmakonzentration und dem Tumorstadium maligner Gliome

In einer Studie konnte bekanntlich sowohl immunhistochemisch als auch anhand der Serumkonzentration gezeigt werden, dass die OPN-Expression in Glioblastomen gegenüber anaplastischen Gliomen verstärkt ist (Sreekanthreddy et al., 2010). Eine weitere interessante Frage an diese Studie war deshalb, ob sich diese Beobachtung auch anhand der OPN-Plasmakonzentration bestätigen lässt.

Tatsächlich war die mittlere OPN-Konzentration zu allen Abnahmezeitpunkten in der Gruppe der Glioblastompatienten höher als in der Patientengruppe mit anaplastischen Gliomen. Dies erreicht zwar zu keinem Zeitpunkt statistische Signifikanz, zeigt aber zu

T1 einen Trend zur Signifikanz. Dies müsste mit einer Studie mit größerer Patientenzahl untermauert werden.

Beim Vergleich meiner Messwerte mit denen aus anderen Studien ist zu beachten, dass mit unterschiedlichen OPN-ELISA-Kits gemessene Absolutwerte oft stark voneinander abweichen. Bezüglich der gemessenen relativen Unterschiede sind sie aber dennoch mit einer gewissen Vorsicht miteinander vergleichbar (*Vordermark et al., 2006*).

### **5.3 Zusammenhang zwischen der OPN-Plasmakonzentration und den radiologisch vermessenen Volumenparametern**

Die vorliegenden Daten legen einen Zusammenhang zwischen den in präoperativen MRT- und CT-Bildern vermessenen Volumenparametern und der OPN-Plasmakonzentration sehr nahe. Mit zunehmendem absoluten Nekrose-, absoluten Tumor- und relativen Nekrosevolumen steigt die OPN-Konzentration zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 an. Auf den zunächst etwas irritierenden Zusammenhang der OPN-Konzentration in postoperativen Plasmaproben (T1, T2) mit der präoperativen Bildgebung wird unter 5.3.4 eingegangen.

#### **5.3.1 Einfluss von „Ausreißern“ auf die errechneten Signifikanzwerte**

Die errechneten Signifikanzwerte schwanken sehr stark, je nachdem wie die zu vergleichenden Patientengruppen definiert werden. Ein extremes Beispiel sind relatives Nekrosevolumen und OPN-Plasmakonzentration zum Abnahmezeitpunkt T2. Definiert man die Gruppen anhand des medianen relativen Nekrosevolumens und vergleicht die mittlere OPN-Konzentration in beiden Gruppen, ergibt sich ein hochsignifikanter Zusammenhang ( $p = 0.009$ ). Definiert man die Gruppen jedoch umgekehrt anhand der medianen OPN-Konzentration und vergleicht das mittlere relative Nekrosevolumen in diesen Gruppen, zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0.3$ ). Dieser scheinbare Widerspruch erklärt sich durch die relativ kleine Patientenzahl. Die geringe Datenbasis erlaubt vorhandenen „Ausreißern“ in den Daten, die Signifikanzwerte stark zu beeinflussen. Ein solcher Ausreißer kann, je nachdem welcher Gruppe er zugeordnet wird, den statistischen Zusammenhang zwischen zwei Parametern verbessern oder verschlechtern, obwohl möglicherweise der reale Zusammenhang dazwischen liegt.

Verzichtet man deshalb auf die Definition zweier Gruppen und betrachtet die Daten stattdessen als kontinuierliche Punktwolke, so kann man den Trend zu größerem absolutem Tumor-, absolutem Nekrose- und relativem Nekrosevolumen bei höherer OPN-Plasmakonzentration zu T0, T1 und T2 stets mehr oder weniger deutlich erkennen. Wegen der nur sehr lückenhaften Daten über die OPN-Konzentration zum Zeitpunkt T3 ist mir zu diesem Zeitpunkt keine diesbezügliche Aussage möglich.

### **5.3.2 OPN als Plasmamarker der Gewebhypoxie maligner Gliome**

In der Gesamtbetrachtung scheint die OPN-Plasmakonzentration am besten mit dem relativen Nekrosevolumen zu korrelieren, schlechter mit dem absoluten Tumolvolumen und am schlechtesten mit dem absoluten Nekrosevolumen.

Gerade das absolute Nekrosevolumen ist aber für die ursprüngliche Fragestellung über OPN als Hypoxiemarker besonders entscheidend. Es dürfte von den drei erfassten Volumenparametern am ehesten die Abschätzung der absoluten hypoxischen Tumorlast ermöglichen, da das Volumen der hypoxischen Übergangszone unmittelbar mit dem absoluten Nekrosevolumen zusammenhängen dürfte (ausführliche Erläuterung unter 3.3.1). Sollte aber OPN tatsächlich ein guter Plasmamarker für das Ausmaß der bestehenden Tumorphypoxie sein, so müsste eine gute Korrelation zwischen OPN-Plasmakonzentration und absoluter hypoxischer Tumorlast bestehen.

Dass aber das absolute Nekrosevolumen und die OPN-Plasmakonzentration dennoch nur sehr schlecht miteinander korrelieren, lässt zwei alternative Schlüsse zu: Entweder besteht doch kein enger Zusammenhang zwischen der OPN-Plasmakonzentration und der hypoxischen Gewebsmasse in malignen Gliomen oder das in der präoperativen Schnittbildgebung vermessene Tumornekrosevolumen ist als Surrogatparameter für das Ausmaß der Tumorphypoxie ungeeignet.

Gerade Letzteres muss in Erwägung gezogen werden. Der Nekroserandsaum bildet zwar vermutlich einen bedeutenden Teil des hypoxischen Gesamtvolumens, aber mikroskopische Nekrosezonen oder nicht-nekrotische hypoxische Areale werden durch die Vermessung des absoluten Nekrosevolumens nicht erfasst. Mit der erläuterten Methode kann deshalb keine präzise Messung, sondern nur eine grobe Abschätzung des Ausmaßes der Tumorphypoxie möglich sein. Würde dies zuverlässig gelingen, so wäre die Methode dennoch sehr nützlich, weil keine zusätzlichen Untersuchungen nötig sind. Da das Verfahren wissenschaftlich nicht untersucht ist, war es deshalb ein Nebenziel

dieser Arbeit, zu evaluieren, ob es für die klinische Forschung geeignet sein könnte. Dieser Nachweis ließe sich aber wohl besser durch einen direkten Vergleich mit etablierten Verfahren zur Messung des Sauerstoffpartialdrucks erbringen.

Aufgrund dessen ist mit der vorliegenden Arbeit leider keine Aussage zu der Frage möglich, ob OPN ein Plasmamarker der Gewebhypoxie in malignen Gliomen ist. Wegen der möglicherweise erschwerten Diffusion zwischen hypoxischem Gewebe und dem Blutkreislauf (siehe 5.1.3) ist dies zumindest kritisch zu hinterfragen. Zur weiteren Evaluierung der Frage wäre eine Studie sinnvoll, in der die OPN-Plasmakonzentration wie in der vorliegenden Arbeit mittels ELISA zu mehreren Zeitpunkten bestimmt, aber die Sauerstoffsättigung im Tumor direkt ermittelt wird. Dies wäre durch intraoperative Sondenmessung oder präoperative Injektion exogener Hypoxiemarker möglich.

### **5.3.3 OPN als Plasmamarker der Malignität maligner Gliome**

Die Tatsache, dass das relative Nekrosevolumen mit der OPN-Plasmakonzentration besonders gut zu korrelieren scheint, ist jedoch auch eine interessante Beobachtung und führt zu einer anderen Interpretation.

Ein großes relatives Nekrosevolumen, also ein großer Anteil nekrotischen Gewebes an der Tumormasse, könnte ein Indiz sein für sehr rasches Tumorwachstum und/oder ausgeprägte Entdifferenzierung - Der Tumor breitet sich rasch radiär aus, ohne die adäquate Versorgung der Tumorzellen in seinem Inneren sicherzustellen. Ein großes relatives Nekrosevolumen spräche demnach für eine besondere Malignität des Tumors.

Darauf gibt es einige Hinweise. In einer Studie an 38 Glioblastompatienten überlebten Patienten mit einem zentralen Nekrosevolumen von weniger als 47% des gesamten Tumolvolumens im Mittel 17.5 Monate, solche mit größerem Nekroseanteil dagegen nur 10.5 Monate ( $p=0.0004$ ) (*Pierallini et al., 1998*). In einer anderen Studie an Astrozytompatienten zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen relativem Nekrosevolumen und der Proliferationsrate, allerdings nicht mit der Überlebenszeit (*Flynn et al., 2008*). Die Volumenparameter waren in beiden Studien, wie in der vorliegenden, in präoperativen Schnittbildern vermessen worden. In einer kleinen Studie an Oligodendrogliompatienten war eine ringförmige Kontrastmittelanreicherung im MRT, bekanntermaßen Korrelat einer zentralen Nekrosezone, mit einer signifikant verkürzten rezidivfreien Überlebenszeit assoziiert (*Choi et al., 2010*). Wie unter 4.4.4 dargestellt, war ein Zusammenhang zwischen einem großen relativen Nekrosevolumen

und einer verkürzten Überlebenszeit auch in der vorliegenden Studie feststellbar, mit einem Trend zur Signifikanz.

„Malignität“ steht bei malignen Gliomen neben hoher Mitoserate, Apoptose- und Strahlenresistenz insbesondere für eine hohe Infiltrationsfähigkeit, denn die infiltrativen Zellen im „gesunden“ Hirnparenchym sind verantwortlich für die konstitutiven Lokalrezidive. Würde eine hohe OPN-Plasmakonzentration also tatsächlich auf eine besondere Infiltrativität der malignen Gliomzellen hinweisen, was angesichts der bekannten Rolle von OPN in der Tumorbilogie sehr plausibel erscheint, so wäre OPN ein ausgesprochen nützlicher prognostischer Marker. Es würde dann nämlich eine für die Prognose besonders entscheidende Tumoreigenschaft markieren.

#### **5.3.4 Korrelation der präoperativen Volumenparameter mit postoperativen OPN-Werten**

Auf eine Auffälligkeit in meinen Beobachtungen muss hier noch hingewiesen werden. Der Zusammenhang zwischen OPN-Plasmakonzentration und präoperativ vermessenen Volumenparametern besteht nicht nur zum präoperativen Abnahmezeitpunkt T0, sondern auch zu den postoperativen Zeitpunkten T1 und T2. Dies ist bemerkenswert, weil ungefähr die Hälfte der Studienpatienten einer makroskopischen Totalresektion des Tumors und damit des vermessenen Gewebsvolumens unterzogen worden ist.

Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete Zusammenhang zwischen der OPN-Konzentration und den Volumenparametern eher nicht auf eine direkte OPN-Sekretion aus dem vermessenen Gewebsvolumen zurückzuführen ist. Vielmehr ist ein indirekter Zusammenhang anzunehmen, der auch postoperativ bestehen bleibt. Ein Beispiel wäre wiederum der Zusammenhang zwischen OPN-Plasmakonzentration und hohem Malignitätsgrad des Tumors. Der Hauptanteil des prä- wie postoperativ nachweisbaren Plasma-OPN könnte dabei, wie unter 5.1.4 erläutert, vorwiegend aus infiltrativen Tumorzellen stammen, die sich im gesund erscheinenden, perifokalen Gewebe befinden. Auch diese Beobachtung könnte also die Interpretation von OPN als Malignitätsmarker unterstützen.

## **5.4 Zusammenhang zwischen der OPN-Plasmakonzentration und der Gesamtüberlebenszeit**

Eine sehr wichtige Frage an diese Arbeit war, ob die OPN-Plasmakonzentration Aussagen über die Prognose der Patienten ermöglicht. In der Tat legen meine Daten einen Zusammenhang zwischen einer hohen OPN-Plasmakonzentration und einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit malignen Gliomen nahe. Im Gesamtkollektiv stellen eine hohe OPN-Konzentration zum Zeitpunkt T2 und ein rascher OPN-Konzentrationsanstieg von T0 oder T1 zu T2 signifikante Risikofaktoren für eine verkürzte Überlebenszeit dar.

Dies ist ein weiteres, starkes Indiz dafür, dass zumindest ein Teil des im Plasma nachweisbaren OPN tatsächlich tumorspezifisch ist und direkte Rückschlüsse auf das biologische Verhalten des Tumors zulässt. Es unterstützt zudem wiederum die Interpretation von OPN als Malignitätsmarker bei malignen Gliomen.

### **5.4.1 Einfluss des Abnahmezeitpunktes**

Anhand der begrenzten Datenbasis ist der genannte Zusammenhang zu den Zeitpunkten T0, T1 und T3 im Gesamtkollektiv nicht signifikant. Einiges spricht jedoch dafür, dass auch zu diesen Zeitpunkten ein entsprechender Zusammenhang besteht. Sowohl im Gesamtkollektiv als auch in allen sechs unter 5.4.2 erläuterten Untergruppen ist nämlich bis auf wenige Ausnahmen zu jedem Abnahmezeitpunkt die mediane Überlebenszeit bei hoher OPN-Konzentration kürzer als bei niedriger. Zu jedem der vier Zeitpunkte ist dies zudem in mindestens einer der untersuchten Untergruppen signifikant. Der umgekehrte Fall, also hohe OPN-Konzentration bei längerer Überlebenszeit, tritt nur in wenigen Fällen auf und zeigt dabei nie einen Trend zur Signifikanz.

Dass der genannte Zusammenhang nicht stets zu allen vier Abnahmezeitpunkten statistisch nachweisbar ist, führe ich in erster Linie auf die relativ kleine Patientenzahl zurück. Eine größere, ähnlich aufgebaute Studie wäre nötig, um nachzuweisen, dass eine hohe OPN-Plasmakonzentration tatsächlich zu allen betrachteten Zeitpunkten ein Risikofaktor für eine verkürzte Überlebenszeit ist. Meine Daten legen dies nahe.

#### **5.4.2 Einfluss von Resektionsausmaß, Lebensalter und Tumorstadium**

Es ist eine interessante Frage, ob der dokumentierte Zusammenhang einer hohen OPN-Plasmakonzentration mit einer kürzeren Überlebenszeit unmittelbar ist, oder ob weitere Faktoren zugleich die OPN-Konzentration und die Überlebenszeit beeinflussen.

Geringeres Resektionsausmaß, höheres Lebensalter und höheres Tumorstadium, drei wichtige Risikofaktoren für eine kürzere Überlebenszeit von Patienten mit malignen Gliomen, korrelieren auch in dieser Studie mit einem früheren Tod, Lebensalter und Tumorstadium sogar hochsignifikant.

Bei Patienten mit und ohne Tumortotalresektion, bei jüngeren und älteren Patienten und bei Glioblastompatienten, also in fünf von sechs nach diesen Risikofaktoren definierten Untergruppen besteht zu mindestens einem der Abnahmezeitpunkte zwischen OPN-Plasmakonzentration und Überlebenszeit eine signifikante Korrelation oder ein diesbezüglicher Trend. Nur in der Untergruppe der Patienten mit einem WHO-Grad-III-Gliom ist kein solcher Trend nachweisbar.

Man könnte deshalb erwägen, dass der Überlebensvorteil bei niedriger OPN-Plasmakonzentration im Gesamtkollektiv eventuell nicht direkt auf die höhere OPN-Sekretion zurückzuführen ist, sondern darauf, dass Glioblastome mehr OPN sezernieren als WHO-Grad-III-Gliome. In diesem Fall dürfte aber sowohl bei isolierter Betrachtung von Patienten mit WHO-Grad-III-Gliom, als auch von solchen mit Glioblastom kein Zusammenhang zwischen OPN-Konzentration und Überlebenszeit feststellbar sein. Bei Glioblastompatienten besteht aber in der vorliegenden Studie ein solcher signifikanter Zusammenhang. Die wahrscheinlichere Ursache ist deshalb wiederum die geringe Patientenzahl, denn die Gruppe der Patienten mit WHO-Grad-III-Gliom ist mit nur 12 Patienten die kleinste der sechs Untergruppen. Außerdem überlebten in dieser Gruppe besonders viele Patienten bis zum Studienende, nämlich 7 von 12. Damit ist die Aussagekraft der errechneten medianen Überlebenszeit zusätzlich eingeschränkt.

Meine Daten sprechen somit dafür, dass eine hohe OPN-Plasmakonzentration ein von Resektionsausmaß, Lebensalter und Tumorstadium unabhängiger Risikofaktor für eine verkürzte Überlebenszeit bei malignen Gliomen ist. Abermals wäre aber eine größere Studie nötig, um dieses Ergebnis zu untermauern.

## 5.5 Schlussfolgerung

In der Zusammenschau der Ergebnisse ergibt sich ein schlüssiges Gesamtbild. Eine höhere OPN-Plasmakonzentration bei größerem relativen Nekrosevolumen, eine unabhängig von Resektionsausmaß, Tumorstadium und Lebensalter verkürzte Überlebenszeit bei höherer OPN-Konzentration und ein Trend zu höherer OPN-Konzentration bei Glioblastomen als bei anaplastischen Gliomen - All dies führt zu der Interpretation, dass OPN bei malignen Gliomen ein Plasmamarker für die Malignität ist. Seinen Wert als Malignitätsmarker scheint OPN dabei auch nach einer Totalresektion des Tumors zu behalten, möglicherweise, weil vor allem infiltrative Zellen im scheinbar gesunden Hirnparenchym zur erhöhten OPN-Plasmakonzentration beitragen. Damit wäre OPN ein besonders wertvoller Marker, denn er würde gerade jene Zellen nachweisen, die die schlechte Prognose maligner Gliome maßgeblich bestimmen. Da ein Übertritt von OPN ins Blut vor Therapiebeginn eventuell durch die Blut-Hirn-Schranke behindert wird, wäre möglicherweise aber für die frühzeitige Diagnostik eher die OPN-Liquorkonzentration interessant.

Das Ausmaß der Hypoxie im Tumorgewebe ist ebenfalls ein Malignitätszeichen und es ist weiterhin möglich, dass auch sie einen Einfluss auf die OPN-Plasmakonzentration hat. Mit der vorliegenden Studie lässt sich dies jedoch nicht untermauern, da das präoperativ vermessene Volumen der zentralen Tumornekrose offenbar kein zuverlässiger Surrogatparameter für die Tumorphypoxie ist.

Im Abschnitt „Diskussion“ ist bereits auf mehrere denkbare Studiendesigns hingewiesen worden, mit deren Hilfe die vorgeschlagenen Hypothesen weiter erforscht und möglicherweise bestätigt werden könnten. Ein generelles Problem der vorliegenden Studie ist die relativ geringe Patientenzahl. OPN ist ein recht unspezifischer Marker, deshalb wäre es insbesondere wünschenswert, die aufschlussreichen Studienergebnisse mit einer ähnlich aufgebauten, aber größeren Studie zu überprüfen.

Der Aufwand wäre gerechtfertigt. Da die weitere klinische Forschung in absehbarer Zeit zu weitaus differenzierteren therapeutischen Strategien im Kampf gegen maligne Gliome führen dürfte, wird auch die frühzeitige Selektion geeigneter Patienten für bestimmte Therapieansätze an Bedeutung gewinnen. Ein Plasmamarker der Tumormalignität, insbesondere der Infiltrativität, könnte dafür sehr geeignet sein, und dafür wäre Osteopontin nach den vorliegenden Daten ein viel versprechender Kandidat.



## **6. Zusammenfassung**

Zielstellung: Ich führte eine prospektive Beobachtungsstudie an 33 Patienten mit malignen Gliomen (Glioblastom, anaplastisches Astrozytom, anaplastisches Oligodendrogliom) zur Evaluation von Osteopontin als Plasmamarker für hypoxisches Gewebe in diesen Tumoren durch.

Methoden: Ich gewann zu vier Therapiezeitpunkten (T0 - präoperativ, T1 - vor Beginn und T2 - nach Ende der Bestrahlung, T3 - erste Nachsorgeuntersuchung) Plasmaproben, in denen die OPN-Konzentration mittels ELISA bestimmt wurde. Als Surrogatparameter für die Tumorphoxie wurde das Volumen der zentralen Tumornekrose in präoperativen MRT- und CT-Aufnahmen vermessen, außerdem auch das Gesamtvolumen des Tumors. Die Patienten wurden nachverfolgt und die Überlebenszeit ermittelt.

Ergebnisse: Es zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der OPN-Konzentration von Therapiezeitpunkt zu Therapiezeitpunkt, was von T0 zu T2 Signifikanz erreicht (465 vs. 696 ng/ml,  $p = 0.01$ ). Für das absolute Nekrose- und absolute Tumolvolumen, aber am besten für das relative Nekrosevolumen (Nekrosevolumen / Tumolvolumen), das eher ein Malignitäts- als ein Hypoxiemarker ist, zeigte sich eine positive Korrelation zwischen großem Volumen und hoher OPN-Plasmakonzentration. Zum Zeitpunkt T2 hatten Patienten mit einem kleinen bzw. großen relativen Nekrosevolumen eine mittlere OPN-Plasmakonzentration von 366 ng/ml bzw. 753 ng/ml ( $p = 0.005$ ). Die Gesamtüberlebenszeit war bei Patienten mit hoher OPN-Plasmakonzentration verkürzt, z.B. hatten Patienten mit niedriger bzw. hoher OPN-Konzentration zum Zeitpunkt T2 eine mediane Überlebenszeit von 567 bzw. 220 Tagen ( $p = 0.02$ ).

Schlussfolgerung: Osteopontin ist nach den vorliegenden Daten ein vielversprechender Plasmamarker der Tumormalignität bei malignen Gliomen und wird vermutlich hauptsächlich von infiltrativen Tumorzellen im makroskopisch gesunden Umgebungsparenchym gebildet. Diese können bei der Operation nicht entfernt werden, deshalb steigt die OPN-Plasmakonzentration postoperativ weiter an. Die Eignung von OPN als Hypoxiemarker bei malignen Gliomen bleibt unklar, weil das Volumen der zentralen Tumornekrose als Surrogatparameter der Tumorphoxie nicht ausreichend validiert ist.

## 7. Literaturverzeichnis

Arai M, Yokosuka O, Kanda T, Fukai K, Imazeki F, Muramatsu M, Seki N, Miyazaki M, Ochiai T, Hirasawa H, Saisho H (2006) Serum osteopontin levels in patients with acute liver dysfunction. *Scand J Gastroenterol* 41:102-110.

Asaka M, Ohta K, Muramatsu T, Kurokawa M, Kizaki H, Hashimoto S, Shimono M (2006) The expression and localization of osteopontin in the mouse major salivary glands. *Arch Histol Cytol* 69(3):181-188.

Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H (2000) Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 287:860-864.

Bache M, Kappler M, Said HM, Staab A, Vordermark D (2008) Detection and specific targeting of hypoxic regions within solid tumors: current preclinical and clinical strategies. *Curr Med Chem* 15(4):1-17.

Bache M, Kappler M, Wichmann H, Rot S, Hahnel A, Greither T, Said HM, Kotzsch M, Würfl P, Taubert H, Vordermark D (2010) Elevated tumor and serum levels of the hypoxia-associated protein osteopontin are associated with prognosis for soft tissue sarcoma patients. *BMC Cancer* 10:132.

Bache M, Reddemann R, Said HM, Holzhausen HJ, Taubert H, Becker A, Kuhnt T, Hänsgen G, Dunst J, Vordermark D (2006) Immunohistochemical detection of osteopontin in advanced head-and-neck cancer: prognostic role and correlation with oxygen electrode measurements, hypoxia-inducible-factor-1 $\alpha$ -related markers, and haemoglobin levels. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66(5):1481-1487.

Beshensky AM, Wesson JA, Worcester EM, Sorokina EJ, Snyder CJ, Kleinman JG (2001) Effects of urinary macromolecules on hydroxyapatite crystal formation. *J Am Soc Nephrol* 12:2108–2116.

Blasberg JD, Pass HI, Goparaju CM, Flores RM, Lee S, Donington JS (2010) Reduction of elevated plasma osteopontin levels with resection of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28:936-941.

Blasi F (1999) Proteolysis, cell adhesion, chemotaxis, and invasiveness are regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-1 system. *Thromb Haemost* 82(2):298-304.

Bleumer I, Oosterwijk E, Oosterwijk-Wakka JC, Völler MC, Melchior S, Warnaar SO, Mala C, Beck J, Mulders PF (2006) A clinical trial with chimeric monoclonal antibody WX-G250 and low dose interleukin-2 pulsing scheme for advanced renal cell carcinoma. *J Urol* 175(1):57-62.

Brennan DJ, Jirstrom K, Kronblad Å, Millikan RC, Landberg G, Duffy MJ, Rydén L, Gallagher WM, O'Brien SL (2006) CA IX is an independent prognostic marker in premenopausal breast cancer patients with one to three positive lymph nodes and a putative marker of radiation resistance. *Clin Cancer Res* 12(21):6421-6431.

Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW (1996) Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56:941-943.

Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA (1994) Integrin  $\alpha v \beta 3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79:1157-1164.

Brown JM, Wilson WR (2004) Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 4:437-447.

Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR (1992) Expression and distribution of osteopontin in human tissues: Widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 3:1169-1180.

Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B, Manseau EJ, Tognazzi K, Perruzzi CA, Dvorak HF, Senger DR (1994) Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol* 145:610-623.

Burri P, Djonov V, Aebersold DM, Lindel K, Studer U, Altermatt HJ, Mazzucchelli L, Greiner RH, Gruber G (2003) Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56(2) 494-501.

Chakraborty G, Jain S, Kundu GC (2008) Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms. *Cancer Res* 68(1):152–161.

Chambers AF, Matrisian LM (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 89:1260–1270.

Chen YJ, Wei YY, Chen HT, Fong YC, Hsu CJ, Tsai CH, Hsu HC, Liu SH, Tang CH (2009) Osteopontin increases migration and MMP-9 up-regulation via  $\alpha v\beta 3$  Integrin, FAK, ERK, and NF- $\kappa$ B-dependent pathway in human chondrosarcoma cells. *J Cell Physiol* 221:98–108.

Choi KY, Jung TY, Jung S, Kim YH, Moon KS, Kim IY, Kang SS, Lee KH (2010) Prognosis of oligodendroglial tumor with ring enhancement showing central necrotic portion. *J Neurooncol* 103(1):103-110.

Collingridge DR, Piepmeier JM, Rockwell S, Knisely JP (1999) Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoural brain tissue. *Radiother Oncol* 53:127-131.

Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP (2002) Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 62:3387–3394.

Cook AC, Tuck AB, McCarthy S, Turner JG, Irby RB, Bloom GC, Yeatman TJ, Chambers AF (2005) Osteopontin induces multiple changes in gene expression that reflect the six “hallmarks of cancer” in a model of breast cancer progression. *Mol Carcinog* 43:225–236.

Dai J, Li B, Shi J, Peng L, Zhang D, Qian W, Hou S, Zhao L, Gao J, Cao Z, Zhao J, Wang H, Guo Y (2009) A humanized anti-osteopontin antibody inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 59(3):355-366.

Das R, Mahabeleshwar GH, Kundu GC (2003) Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor  $\kappa$ B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathways in breast cancer cells. *J Biol Chem* 278(31):28593–28606.

Del Rowe J, Scott C, Werner-Wasik M, Bahary JP, Curran WJ, Urtasun RC, Fisher B (2000) Single-arm, open-label phase II study of intravenously administered tirapazamine and radiation therapy for glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 18(6):1254-1259.

Denda S, Reichardt LF, Müller U (1998) Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin  $\alpha 8\beta 1$  and potential roles for this integrin–ligand interaction in kidney morphogenesis. *Mol Biol Cell* 9:1425–1435.

Denhardt DT, Guo X (1993) Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7:1475-1482.

Dhore CR, Cleutjens JPM, Lutgens E, Cleutjens KBJM, Geusens PPM, Kitslaar PJEHM, Tordoir JHM, Spronk HMH, Vermeer C, Daemen MJAP (2001) Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1998-2003.

Ding Q, Stewart J Jr, Prince CW, Chang PL, Trikha M, Han X, Grammer JR, Gladson CL (2002) Promotion of malignant astrocytoma cell migration by osteopontin expressed

in the normal brain: differences in integrin signaling during cell adhesion to osteopontin versus vitronectin. *Cancer Res* 62(18):5336-5343.

Du XL, Jiang T, Sheng XG, Gao R, Li QS (2009) Inhibition of osteopontin suppresses in vitro and in vivo angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 115:371–376.

Durand RE, Raleigh JA (1998) Identification of nonproliferating but viable hypoxic tumor cells in vivo. *Cancer Res* 58:3547-3550.

Eschwège F, Sancho-Garnier H, Chassagne D, Brisgand D, Guerra M, Malaise EP, Bey P, Busutti L, Cionini L, N'Guyen T, Romanini A, Chavaudra J, Hill C (1997) Results of a european randomized trial of etanidazole combined with radiotherapy in head and neck carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39(2):275-281.

Evans SM, Judy KD, Dunphy I, Jenkins WT, Hwang WT, Nelson PT, Lustig RA, Jenkins K, Magarelli DP, Hahn SM, Collins RA, Grady MS, Koch CJ (2004) Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* 10(24):8177-8184.

Fauquette W, Amourette C, Dehouck MP, Diserbo M. (2011) Radiation-induced blood-brain barrier damages: an in vitro study. *Brain Res* 1433:114-126.

Flynn JR, Wang L, Gillespie DL, Stoddard GJ, Reid JK, Owens J, Ellsworth GB, Salzman KL, Kinney AY, Jensen RL (2008) Hypoxia-regulated protein expression, patient characteristics, and preoperative imaging as predictors of survival in adults with glioblastoma multiforme. *Cancer* 113(5):1032-1042.

Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, Kimura S, Ishikura H (2005) Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vasc Health Risk Manag* 1(4):277–290.

Geissinger E, Weisser C, Fischer P, Scharl M, Wellbrock C (2002) Autocrine stimulation by osteopontin contributes to antiapoptotic signalling of melanocytes in dermal collagen. *Cancer Res* 62:4820–4828.

Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M (1998) Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol* 152:353-358.

Goparaju CMV, Pass HI, Blasberg JD, Hirsch N, Donington JS (2010) Functional heterogeneity of osteopontin isoforms in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5(10):1516–1523.

Graeber TG, Osmanian TJ, Housman DE, Koch JK, Lowe SW, Giaccia A (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379:88-91.

Grote J und Pohl U: Sauerstoffversorgung der Gewebe. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G (Hrsg): *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 29. Aufl. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005, S. 810-811.

Haber RS, Rathan A, Weiser KR, Pritsker A, Itzkowitz SH, Bodian C, Slater G, Weiss A, Burstein DE (1998) GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma - a marker for poor prognosis. *Cancer* 83:34–40.

Hacke W, Gumbinger C, Wick W: Hirntumoren. In: Hacke W (Hrsg): *Neurologie*. 13. Aufl. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010, S. 312-314.

Hahnel A, Wichmann H, Kappler M, Kotsch M, Vordermark D, Taubert H, Bache M (2010) Effects of osteopontin inhibition on radiosensitivity of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Radiat Oncol* 5:82.

Horsman MR, Chaplin DJ, Brown JM (1987) Radiosensitization by nicotinamide in vivo: a greater enhancement of tumor damage compared to that of normal tissues. *Radiat Res* 109(3):479-489.

Hoskin PJ, Rojas AM, Bentzen SM, Saunders MI (2010) Radiotherapy with concurrent carbogen and nicotinamide in bladder carcinoma. *J Clin Oncol* 28:4912-4918.

Hu Z, Lin D, Yuan J, Xiao T, Zhang H, Sun W, Han N, Ma Y, Di X, Gao M, Ma J, Zhang J, Cheng S, Gao Y (2005) Overexpression of osteopontin is associated with more aggressive phenotypes in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11(13):4646-4652.

Hui EP, Sung FL, Yu BKH, Wong CSC, Ma BBY, Lin X, Chan A, Wong W, Chan ATC (2008) Plasma osteopontin, hypoxia, and response to radiotherapy in nasopharyngeal cancer. *Clin Cancer Res* 14(21):7080-7087.

Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA (1996) Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 317:59-64

Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM (2002) Hsp90 regulates a von hippel lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -degradative pathway. *J Biol Chem* 277:29936-29944.

Ito T, Hashimoto Y, Tanaka E, Kan T, Tsunoda S, Sato F, Higashiyama M, Okumura T, Shimada Y (2006) An inducible short-hairpin RNA vector against osteopontin reduces metastatic potential of human esophageal squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 12(4):1308-1316.

Jang T, Savarese T, Low HP, Kim S, Vogel H, Lapointe D, Duong T, Litofsky NS, Weimann JM, Ross AH, Recht L (2006) Osteopontin expression in intratumoral astrocytes marks tumor progression in gliomas induced by prenatal exposure to N-ethyl-N-nitrosourea. *Am J Pathol* 168(5):1676-1685.

Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M (2001) Induction of HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 15(7):1312-1314.

Kaanders JHAM, Wijffels KIEM, Marres HAM, Ljungkvist ASE, Pop LAM, van den Hoogen FJA, de Wilde PCM, Bussink J, Raleigh JA, van der Kogel AJ (2002)



Pimonidazole binding and tumor vascularity predict for treatment outcome in head and neck cancer. *Cancer Res* 62:7066–7074.

Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Mäenpää PH (1998) Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J Biol Chem* 274(3):1729–1735.

Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H, Tanaka K, Chikuma S, Yagita H, Okumura K, Murakami M, Saiki I, Chambers AF, Uede T (1999) CD44 variants but not CD44s cooperate with  $\beta$ 1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 59:219-226.

Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SA, Fack F, Thorsen F, Taxt T, Bartos M, Jirik R, Miletic H, Wang J, Stieber D, Stuhr L, Moen I, Rygh CB, Bjerkvig R, Niclou SP (2011) Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(9):3749-3754.

Kim JH, Skates SJ, Uede T, Wong KK, Schorge JO, Feltmate CM, Berkowitz RS, Cramer DW, Mok SC (2002) Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA* 287:1671-1679.

Kim JK, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362:841-844.

Kleihues P, Kiessling M, Wiestler OD: Tumoren des Nervensystems. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg): Pathologie. 3. Aufl. Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München-Jena, 2005, S. 317-321.

Lally BE, Rockwell S, Fischer DB, Collingridge DR, Piepmeier JM, Knisely JP (2006) The interactions of polarographic measurements of oxygen tension and histological grade in human glioma. *Cancer J* 12(6):461-466.

Lamour V, Le Mercier M, Lefranc F, Hagedorn M, Javerzat S, Bikfalvi A, Kiss R, Castronovo V, Bellahcène A (2010) Selective osteopontin knockdown exerts anti-tumoral activity in a human glioblastoma model. *Int J Cancer* 126(8):1797-1805.

Le QT, Sutphin PD, Raychaudhuri S, Yu SCT, Terris DJ, Lin HS, Lum B, Pinto HA, Koong AC, Giacchia AJ (2002) Identification of osteopontin as a prognostic plasma marker for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 9:59-67.

Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM (1994) Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res* 74:214-224.

Likui W, Hong W, Shuwen Z, Yuangang Y, Yan W (2011) The potential of osteopontin as a therapeutic target for human colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* 15:652–659.

Lim AM, Rischin D, Fisher R, Cao H, Kwok K, Truong D, McArthur GA, Young RJ, Giaccia AJ, Peters L, Le QT (2012) Prognostic significance of plasma osteopontin in patients with locoregionally advanced head and neck squamous cell carcinoma treated on TROG 02.02 phase III trial. *Clin Cancer Res* 18(1):301-307.

Ljungkvist ASE, Bussink J, Rijken PFJW, Raleigh JA, Denekamp J, van der Kogel AJ (2000) Changes in tumor hypoxia measured with a double hypoxic marker technique. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48(5):1529-1538.

Mack PC, Redman MW, Chansky K, Williamson SK, Farneth NC, Lara PN Jr, Franklin WA, Le QT, Crowley JJ, Gandara DR (2008) Lower osteopontin plasma levels are associated with superior outcomes in advanced non-small-cell lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy: SWOG study S0003. *J Clin Oncol* 26:4771-4776.

Maria BL, Eskin TA, Quisling RG (1993) Brainstem and other malignant gliomas: II. possible mechanisms of brain infiltration by tumor cells. *J Child Neurol* 8:292-305.

Matusan-Ilijas K, Behrem S, Jonjic N, Zarkovic K, Lucin K (2008) Osteopontin expression correlates with angiogenesis and survival in malignant astrocytoma. *Pathol Oncol Res* 14(3):293-298.

McKee MD, Glimcher MJ, Nanci A (1992) High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anat Rec* 234(4):479-492.

McKee MD, Nanci A (1996) Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech* 33(2):141-164.

McKee MD, Pedraza CE, Kaartinen MT (2011) Osteopontin and wound healing in bone. *Cells Tissues Organs* 194:313–319.

Miralbell R, Mornex F, Greiner R, Bolla M, Storme G, Hulshof M, Bernier J, Denekamp J, Rojas AM, Pierart M, van Glabbeke M, Mirimanoff RO (1999) Accelerated radiotherapy, carbogen, and nicotinamide in glioblastoma multiforme: report of European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 22933. *J Clin Oncol* 17(10):3143-3149.

Miyauchi A, Alvarez J, Greenfield EM, Teti A, Grano M, Colucci S, Zamboni-Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL, Cheresch D, Hruska KA (1991) Recognition of osteopontin and related peptides by an  $\alpha\beta3$  integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *J Biol Chem* 266(30):20369-20374.

Miyazaki K, Okada Y, Yamanaka O, Kitano A, Ikeda K, Kon S, Uede T, Rittling SR, Denhardt DT, Kao WWY, Saika S (2008) Corneal wound healing in an osteopontin-deficient mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1367–1375.

Münter M: Strahlenbiologie. In: Reiser M, Kuhn FP, Debus J (Hrsg): *Duale Reihe Radiologie*. 2. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2006, S. 25-27, 37-38.

Muramatsu T, Shima K, Ohta K, Kizaki H, Ro Y, Kohno Y, Abiko Y, Shimono M (2004) Inhibition of osteopontin expression and function in oral cancer cell lines by antisense oligonucleotides. *Cancer Lett* 217:87–95.

Obermüller N, Gassler N, Gretz N, Kränzlin B, Hoffmann S, Geiger H, Gauer S (2006) Distinct immunohistochemical expression of osteopontin in the adult rat major salivary glands. *J Mol Hist* 37:53–60.

Ogawa K, Ishiuchi S, Inoue O, Yoshi Y, Saito A, Watanabe T, Iraha S, Toita T, Kakinohana Y, Ariga T, Kasuya G, Murajama S (2012) Phase II trial of radiotherapy after hyperbaric oxygenation with multiagent chemotherapy (procarbazine, nimustine, and vincristine) for high-grade gliomas: long-term results. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 82(2):732–738.

Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, Takahashi R, Kusuhara M, Nakamura H, Ohsuzu F (2003) Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 170:333–337.

Oldberg Å, Franzén A, Heinegård D (1986) Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:8819-8823.

Ostheimer C, Vordermark D: Osteopontin – An indicator of tumor hypoxia and treatment resistance. In: Vordermark D (Hrsg.): *Hypoxia: Causes, Types and Management*. E-Book, 2012, Kapitel 15, pp. 40-41.

Ostheimer C, Wichmann H, Kappler M, Bache M, Kotzsch M, Vordermark D: (2011) Der Plasma-Hypoxiemarker Osteopontin als Prognosefaktor für die Radiotherapie des Bronchialkarzinoms: erste Survival-Analyse. *Exp Strahlenther Klin Strahlenbiol* 20:217-22.

Overgaard J, Eriksen JG, Nordmark M, Alsner J, Horsman MR (2005) Plasma osteopontin, hypoxia, and response to the hypoxia sensitiser nimorazole in radiotherapy

of head and neck cancer: results from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 6:757-764.

Overgaard J, Hansen HS, Overgaard M, Bastholt L, Berthelsen A, Specht L, Lindeløv B, Jørgensen K (1998) A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85. *Radiother Oncol* 46:135-146.

Overgaard J, Horsman MR (1996) Modification of hypoxia-induced radioresistance in tumors by the use of oxygen and sensitizers. *Semin Radiat Oncol* 6(1):10-21.

von Pawel J, von Roemeling R, Gatzemeier U, Boyer M, Elisson LO, Clark P, Talbot D, Rey A, Butler TW, Hirsh V, Olver I, Bergman B, Ayoub J, Richardson G, Dunlop D, Arcenas A, Vescio R, Viallet J, Treat J (2000) Tirapazamine plus cisplatin versus cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a report of the international CATAPULT I study group. *J Clin Oncol* 18:1351-1359.

Persson PB: Flüssigkeitsräume. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G (Hrsg): *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 29. Aufl. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005, S. 710.

Philip S, Bulbule A, Kundu GC (2001) Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor- $\kappa$ B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murin melanoma cells. *J Biol Chem* 276(48):44926-44935.

Pierallini A, Bonamini M, Pantano P, Palmeggiani F, Raguso M, Osti MF, Anaveri G, Bozzao L (1998) Radiological assessment of necrosis in glioblastoma: variability and prognostic value. *Neuroradiology* 40(3):150-153.

Rijken PFJW, Bernsen HJJA, Peters JPW, Hodgkiss RJ, Raleigh JA, van der Kogel AJ (2000) Spatial relationship between hypoxia and the (perfused) vascular network in a

human glioma xenograft: A quantitative multi-parameter analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48(2):571-582.

Rischin D, Peters LJ, O'Sullivan B, Giralt J, Fisher R, Yuen K, Trotti A, Bernier J, Bourhis J, Ringash J, Henke M, Kenny L (2010) Tirapazamine, cisplatin, and radiation versus cisplatin and radiation for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (TROG 02.02, HeadSTART): a phase III trial of the Trans-Tasman Radiation Oncology Group. *J Clin Oncol* 28:2989-2995.

Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, Paulsson M, Lindmark-Månsson H (2007) The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(6):1087–1097.

Rogers SA, Padanilam BJ, Hruska KA, Giachelli CM, Hammerman MR (1997) Metanephric osteopontin regulates nephrogenesis in vitro. *Am J Physiol* 272(Renal Physiol 41):F469-F476.

Rubin P, Gash DM, Hansen JT, Nelson DF, Williams JP (1994) Disruption of the blood-brain barrier as the primary effect of CNS irradiation. *Radiother Oncol* 31(1):51-60.

Said HM, Hagemann C, Staab A, Stojic J, Kühnel S, Vince GH, Flentje M, Roosen K, Vordermark D (2007) Expression patterns of the hypoxia-related genes osteopontin, CA9, erythropoietin, VEGF and HIF-1alpha in human glioma in vitro and in vivo. *Radiother Oncol* 83(3):398-405.

Said HM, Katzer A, Flentje M, Vordermark D (2005) Response of the plasma hypoxia marker osteopontin to in vitro hypoxia in human tumor cells. *Radiother Oncol* 76:200–205.

Saitoh Y, Kuratsu J, Takeshima H, Yamamoto S, Ushio Y (1995) Expression of osteopontin in human glioma. Its correlation with the malignancy. *Lab Invest* 72(1):55-63.

Sakata K, Someya M, Nagakura H, Nakata K, Oouchi A, Hareyama M, Satoh M (2006) A clinical study of hypoxia using endogenous hypoxic markers and polarographic oxygen electrodes. *Strahlenther Onkol* 182:511–517.

Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM (1998) NF $\kappa$ B mediates  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 141(4):1083-1093.

Schlote W, Riede UN, Wiestler OD: Nervensystem. In: Riede UN, Schaefer HE (Hrsg): *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 4. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1999, S. 1078.

Schuhmann MU, Zucht HD, Nassimi R, Heine G, Schneekloth CG, Stuerenburg HJ, Selle H (2009) Peptide screening of cerebrospinal fluid in patients with glioblastoma multiforme. *Eur J Surg Oncol* 36(2):201-207.

Senger DR (1996) Molecular framework for angiogenesis - a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines. *Am J Pathol* 149:1-7.

Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos-Sergiou A, Van de Water L (1994) Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol Biol Cell* 5:565-574.

Singhal H, Bautista DS, Tonkin KS, O'Malley FP, Tuck AB, Chambers AF, Harris JF (1997) Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res* 3:605-611.

Smith LL, Cheung HK, Ling LE, Chen J, Sheppard D, Pytelai R, Giachelli CM (1996) Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 integrin. *J Biol Chem* 271(45):28485–28491.

Sodhi CP, Phadke SA, Batlle D, Sahai A (2001) Hypoxia stimulates osteopontin expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells - potentiation by high glucose. *Diabetes* 50:1482–1490.

Søndergaard KL, Hilton DA, Pennex M, Ollerenshaw M, Demaine AG (2002) Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in tumours of patients with glioblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28:210–217.

Speer MY, Chien YC, Quan M, Yang HY, Vali H, McKee MD, Giachelli CM (2005) Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification in vitro. *Cardiovasc Res* 66:324–333.

Spence AM, Muzi M, Swanson KR, O'Sullivan F, Rockhill JK, Rajendran JG, Adamsen TC, Link JM, Swanson PE, Yagle KJ, Rostomily RC, Silbergeld DL, Krohn KA (2008) Regional hypoxia in glioblastoma multiforme quantified with [18F]fluoromisonidazole positron emission tomography before radiotherapy: correlation with time to progression and survival. *Clin Cancer Res* 14(9):2623-2630.

Sreekanthreddy P, Srinivasan H, Kumar DM, Nijaguna MB, Sridevi S, Vrinda M, Arivazhagan A, Balasubramaniam A, Hegde AS, Chandramouli BA, Santosh V, Rao MR, Kondaiah P, Somasundaram K (2010) Identification of potential serum biomarkers of glioblastoma: serum osteopontin levels correlate with poor prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19(6):1409-1422.

Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn JC, Rohde V, Opperl F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T (2008) Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery* 62(3):564-576.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987-996.



Suzuki M, Mose E, Galloy C, Tarin D (2007) Osteopontin gene expression determines spontaneous metastatic performance of orthotopic human breast cancer xenografts. *Am J Pathol* 171:682–692.

Takano S, Tsuboi K, Tomono Y, Mitsui Y, Nose T (2000) Tissue factor, osteopontin, alphavbeta3 integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression. *Br J Cancer* 82(12):1967-1973.

Takemoto M, Tada K, Nakatsuka K, Moriyama Y, Kazui H, Yokote K, Matsumoto T, Saito Y, Mori S (1999) Effects of aging and hyperlipidemia on plasma osteopontin-level. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi* 36(11):799-802.

Toy H, Yavas O, Eren O, Genc M, Yavas C (2009) Correlation between osteopontin protein expression and histological grade of astrocytomas. *Pathol Oncol Res* 15(2):203-207.

Trepel M: *Neuroanatomie – Struktur und Funktion*. 3. Aufl. Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München-Jena, 2004, S. 9.

Vaschetto R, Nicola S, Olivieri C, Boggio E, Piccolella F, Mesturini R, Damnotti F, Colombo D, Navalesi P, Della Corte F, Dianzani U, Chiocchetti A (2008) Serum levels of osteopontin are increased in SIRS and sepsis. *Intensive Care Med* 34(12):2176-2184.

Vaupel P, Mayer A (2007) Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 26:225–239.

Vaupel P, Thews O, Hoeckel M (2001) Treatment resistance of solid tumors - role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 18(4):243-259.

Vergis R, Corbishley CM, Norman AR, Bartlett J, Jhavar S, Borre M, Heeboll S, Horwich A, Huddart R, Khoo V, Eeles R, Cooper C, Sydes M, Dearnaley D, Parker C (2008) Intrinsic markers of tumour hypoxia and angiogenesis in localised prostate

cancer and outcome of radical treatment: a retrospective analysis of two randomised radiotherapy trials and one surgical cohort study. *Lancet Oncol* 9: 342–351.

Vogt MHJ, Lopatinskaya L, Smits M, Polman CH, Nagelkerken L (2003) Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53:819–822.

Vordermark D, Brown JM (2003) Endogenous markers of tumor hypoxia - predictors of clinical radiation resistance?. *Strahlenther Onkol* 179:801–811.

Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS (2007) Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 25(30):4722-4729.

Wai PY, Guo L, Gao C, Mi Z, Guo H, Kuo PC (2006) Osteopontin inhibits macrophage nitric oxide synthesis to enhance tumor proliferation. *Surgery* 140:132-140.

Wang ZM, Cui YH, Li W, Chen SY, Liu TS (2011) Lentiviral-mediated siRNA targeted against osteopontin suppresses the growth and metastasis of gastric cancer cells. *Oncol Rep* 25(4):997-1003.

Weber GF (2001) The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1552:61-85.

Weber GF, Lett GS, Haubein NC (2010) Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival. *Br J Cancer* 103:861–869.

Weber GF, Zawaideh S, Hikita S, Kumar VA, Cantor H, Ashkar S (2002) Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *J Leukoc Biol* 72:752–761.

Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359:492-507.

Wen SR, Liu GJ, Feng RN, Gong FC, Zhong H, Duan SR, Bi S (2011) Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*, Epub ahead of print doi:10.1016/j.jneuroim.2011.12.004.

Wilson WR, Hay MP (2011) Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11:393-410.

Winter SC, Shah KA, Han C, Campo L, Turley H, Leek R, Corbridge RJ, Cox GJ, Harris AL (2006) The relation between hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression with anemia and outcome in surgically treated head and neck cancer. *Cancer* 107(4):757-766.

Yan W, Qian C, Zhao P, Zhang J, Shi L, Qian J, Liu N, Fu Z, Kang C, Pu P, You Y (2010) Expression pattern of osteopontin splice variants and its functions on cell apoptosis and invasion in glioma cells. *Neuro Oncol* 12(8):765–775.

Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M (1999) Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8156–8160.

Zhang Q, Zhang ZF, Rao JY, Sato JD, Brown J, Messadi DV, Le AD (2004) Treatment with siRNA and antisense oligonucleotides targeted to HIF-1 $\alpha$  induced apoptosis in human tongue squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 111:849–857.

Zhang Y, Forootan SS, Kamalian L, Bao ZZ, Malki MI, Foster CS, Ke Y (2011) Suppressing tumourigenicity of prostate cancer cells by inhibiting osteopontin expression. *Int J Oncol* 38(4):1083-1091.

Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60:1541–1545.

## 8. Thesen

1. Osteopontin ist ein Plasmamarker für den Malignitätsgrad maligner Gliome. Seine Konzentration im Blutplasma ist umso höher, je schneller und infiltrativer der Tumor wächst und je höher dessen Apoptose- und Strahlenresistenz ist.
2. Die Plasmakonzentration von Osteopontin ist deshalb bei Astrozytomen vom WHO-Grad IV höher als bei Astrozytomen vom WHO-Grad III.
3. Osteopontin ist möglicherweise auch ein Plasmamarker für das Ausmaß der bestehenden Tumorphoxie. Dies lässt sich allerdings mit der vorliegenden Arbeit nicht untermauern, weil das in präoperativen MRT- oder CT-Aufnahmen vermessene Volumen der zentralen Tumornekrose offenbar keinen zuverlässigen Surrogatparameter für das Ausmaß der Tumorphoxie darstellt.
4. Eine hohe Osteopontinkonzentration im Blutplasma stellt bei Patienten mit malignen Gliomen einen Risikofaktor für eine verkürzte Überlebenszeit dar, egal ob die Blutprobe präoperativ, postoperativ oder nach der Bestrahlungsphase gewonnen worden ist
5. Der unter Punkt 4 dargestellte Zusammenhang ist möglicherweise unabhängig von den etablierten Risikofaktoren WHO-Grad, Resektionsausmaß und Lebensalter.
6. Die OPN-Konzentration im Blutplasma steigt bei Patienten mit malignen Gliomen im Verlauf der Standardtherapie aus Operation und adjuvanter Radiochemotherapie kontinuierlich an.
7. Eine mögliche Teilerklärung für Punkt 6 ist, dass die tumorassoziierte Osteopontinsekretion ins Blutplasma bei malignen Gliomen vor allem durch infiltrative Tumorzellen im gesund erscheinenden Hirnparenchym erfolgt. Da diese auch bei einer makroskopischen Totalresektion des Tumors nicht entfernt werden können und somit prognosebestimmend sind, wertet dies Osteopontin als Marker der Malignität und der Prognose zusätzlich auf.

8. Eine weitere mögliche Teilerklärung für Punkt 6 ist, dass Osteopontin aus Tumorzellen maligner Gliome präoperativ nur schwer die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Wird diese jedoch operations- und bestrahlungsbedingt permeabel, steigt die Plasmakonzentration von Osteopontin an. Die Bestimmung der Osteopontin-Plasmakonzentration ist deshalb postoperativ eventuell aussagekräftiger. Alternativ könnte präoperativ die Bestimmung der Osteopontinkonzentration im Liquor interessant sein.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

*Name* Peter Cuno, geb. Schmidt  
*Geburtsdatum* 12.08.1985  
*Geburtsort* Berlin  
*Staatsangehörigkeit* deutsch

## Schulbildung

1992 - 1998 1. Grundschule Perleberg  
1998 - 2005 Gottfried-Arnold-Gymnasium Perleberg  
2005 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

## Hochschulbildung

10/2005 – 10/2011 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

09/2007 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08/2010 – 07/2011 Praktisches Jahr:  
1. Tertial: Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
KH St. Elisabeth und St. Barbara, Halle  
2. Tertial: Klinik für Innere Medizin  
BG-Kliniken Bergmannstrost, Halle  
3. Tertial: Klinik für Unfallchirurgie  
BG-Kliniken Bergmannstrost, Halle

10/2011 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/2011 Approbation als Arzt

## Beruf:

Seit 01.04.2012 Weiterbildungsassistent für Pädiatrie an der HELIOS-Klinik Brandenburg-Hohenstücken

Datum .....

Unterschrift .....

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre ausdrücklich, dass es sich bei der von mir eingereichten schriftlichen Arbeit mit dem Titel „Osteopontin als Plasmamarker der Tumorhypoxie bei Patienten mit malignen Gliomen“ um eine von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasste Arbeit handelt.

Ich erkläre ausdrücklich, dass ich *sämtliche* in der oben genannten Arbeit verwendeten fremden Quellen, auch aus dem Internet (einschließlich Tabellen, Grafiken u. Ä.) als solche kenntlich gemacht habe. Insbesondere bestätige ich, dass ich ausnahmslos sowohl bei wörtlich übernommenen Aussagen bzw. unverändert übernommenen Tabellen, Grafiken u. Ä. (Zitaten) als auch bei in eigenen Worten wiedergegebenen Aussagen bzw. von mir abgewandelten Tabellen, Grafiken u. Ä. anderer Autorinnen und Autoren (Paraphrasen) die Quelle angegeben habe.

Datum .....

Unterschrift .....

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich versichere, dass von mir, Peter Cuno, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Datum .....

Unterschrift .....

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. D. Vordermark danke ich für die Ermöglichung der Promotion, das interessante Thema, die stets gute Betreuung im Verlaufe des Promotionsverfahrens und die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Dr. rer. nat. M. Bache und dem gesamten Team des strahlenbiologischen Labors danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der ELISA's und aller praktischen Aspekte meiner Promotion.

Den Ärzten, Schwestern und weiteren Mitarbeitern der Klinik für Neurochirurgie und der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Halle danke ich für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und der Gewinnung der Plasmaprobe.

Darüber hinaus danke ich allen denjenigen, die direkt und indirekt zum Gelingen der Arbeit beitrugen, indem sie mir durch ihren Rat und ihre Unterstützung behilflich waren. In diesem Sinne danke ich ganz besonders auch meiner Familie.