

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

(Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. C.-F. Hess)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Strahleninduzierte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen nach
selektiver Ganzleberbestrahlung *in vivo* (Ratte)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Franz Felix Reuter

aus

München

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. med. H. Christiansen

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel
"Strahleninduzierte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen nach selektiver
Ganzleberbestrahlung *in vivo* (Ratte)"
eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und
Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Einleitung	1
1.1 Inzidenz und Pathogenese primärer und sekundärer Lebertumoren	1
1.1.1 Maligne Primärtumoren der Leber	1
1.1.2 Maligne Sekundärtumoren in der Leber	2
1.2 Onkologische Therapiekonzepte primärer und sekundärer Lebertumoren	2
1.2.1 Primäre Lebertumoren	2
1.2.2 Sekundäre Lebertumoren	4
1.2.3 Die Rolle der Strahlentherapie bei der Behandlung primärer und sekundärer Lebertumoren sowie anderer maligner Oberbauchtumoren.....	5
1.3 Radiation-Induced Liver Disease (RILD)	8
1.3.1 Klinik, Therapie, Histopathologie und Risikofaktoren.....	8
1.3.2 Bisherige experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese und Vergleich mit anderen strahleninduzierten Organschäden sowie anderen toxischen Leberschäden	9
1.3.3 Ziel der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Materialien	11
2.1.1 Geräte	11
2.1.2 Einwegmaterialien	12
2.1.3 Antikörper	12
2.1.4 Primer.....	13
2.1.5 Medikamente	13
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	13
2.1.7 Chemikalien	14

2.1.8	Laborkits	15
2.1.9	Versuchstiere	15
2.2	Methoden	17
2.2.1	Arbeitsprogramm	17
2.2.2	Bestrahlung	17
2.2.3	Gewinnung von Serum und Lebergewebe	17
2.2.4	Herstellung eines Homogenisates aus dem Lebergewebe	18
2.2.5	Real-Time PCR (RT PCR)	18
2.2.6	Western Blot	22
2.2.7	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	25
2.2.8	Statistische Auswertung und Bearbeitung der gewonnenen Daten	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Real-Time PCR	28
3.1.1	Strahleninduzierte Veränderungen der Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6.....	28
3.2	Western Blot.....	35
3.2.1	Nachweis von TNF- α , IL-1 β und IL-6 im Lebergewebe nach Bestrahlung auf Proteinebene mittels Western Blot.....	35
3.3	ELISA	37
3.3.1	Strahleninduzierte Veränderungen der Proteinkonzentrationen der Zytokine im Serum der bestrahlten Ratten im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen	37
4	Diskussion	43
4.1	Bedeutung der ausgewählten pro-inflammatorischen Zytokine bei der toxischen Gewebeschädigung durch Bestrahlung und andere Noxen.....	43
4.1.1	Grundsätzliche Bedeutung der ausgewählten Zytokine.....	43
4.1.2	Strahleninduzierte Expression von TNF- α , IL-6 und IL-1 β nach selektiver Leberbestrahlung im verwendeten Tiermodell und die Rolle strahleninduzierter	

Zytokinexpressionen bei der strahleninduzierten Leberschädigung / anderen strahleninduzierten Organschädigungen	45
4.1.3 Die Rolle der Zytokine bei anderen toxischen Leberschäden	48
4.2 Bedeutung der Ergebnisse dieser Arbeit für die Klinik	49
4.3 Ausblick	50
5 Zusammenfassung	53
6 Tabellenverzeichnis	54
7 Abbildungsverzeichnis.....	55
8 Literaturverzeichnis	56

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ap	<i>Anterior-posterior</i>
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
β -Actin	Beta-Actin
β_1 -Integrin	Beta 1 Integrin
β_2 -Integrin	Beta 2 Integrin
°C	Grad Celsius
CCC	Cholangiokarzinom
CCL ₄	Kohlenstofftetrachlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary-desoxyribonukleinsäure</i>
CsCl	Caesiumchlorid
CT	Computertomographie
CT-Wert	<i>threshold cycle</i> -Wert
DC	<i>detergent compatible</i>
DEB-TACE	<i>drug eluting bead transarterial chemoembolisation</i>

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidine
DTT	Dithiothreitol
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
g	Gramm / Erdbeschleunigung
G	Gauge
Gy	Gray
h	Stunde
H ₂ O	(Destilliertes) Wasser
HAI	<i>hepatic arterial infusion</i>
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCL	Salzsäure (Chlorwasserstoff)
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIFU	<i>high intensity focused ultrasound</i>
HSF	Hepatozyten-stimulierender Faktor
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>

ICAM-2	<i>intercellular adhesion molecule 2</i>
IL-1 α	Interleukin 1 alpha
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
JAM-1	<i>junctional adhesion molecule 1</i>
K	Konzentration
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LA	Laserablation
LDS	<i>lithium dodecyl sulfat</i>
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>

MV	Megavolt
MW	Mittelwert
MWA	Mikrowellenablation
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NfκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nm	Nanometer
NP	Nonylphenoethoxylat
OD	Optische Dichte
p-Wert, p	<i>probability</i> -Wert
pa	<i>posterior-anterior</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pg	Picogramm
pH	pH-Wert
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PTBD	Perkutane transhepatische biliäre Drainage
PVE	Präoperative Portalvenenembolisation

rel.	relativ
RFA	Radiofrequenzablation
RILD	<i>radiation-induced liver disease</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	<i>reverse transcriptase / real-time</i>
r-tPA	<i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
RT PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SIRT	Selektive interne Radiotherapie
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris(hydroxymethyl)-aminomethan buffered saline</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	<i>polyoxyethylenesorbitan monolaurate</i>
U	Umdrehungen
Ubq	Ubiquitin

UDG	Uracil-DNA-glycosylase
V	Volt
V.	<i>vena</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VOD	<i>venoocclusive disease</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

Einleitung

1.1 Inzidenz und Pathogenese primärer und sekundärer Lebertumoren

Die Leber stellt mit einem normalen Organgewicht von 1.000 bis 1.500 g die größte Drüse des Menschen dar (Dietel et al. 2003). Primäre Tumoren im Bereich der Leber zählen in Deutschland zu den 10 häufigsten Tumorentitäten mit einer Neuerkrankungsrate von 14,6 / 100.000 Männer und 5,9 / 100.000 Frauen im Jahr 2010 (RKI und GEKID 2013). Weltweit stehen primäre Lebertumoren an 6. Stelle der Tumorerkrankungen (World Cancer Research Fund International 2016). Sekundäre Lebertumoren sind laut dem Kölner Leberregister mit 45% aller tumorartigen Neubildungen der Leber deutlich häufiger als primäre Lebertumoren. Sie stammen meistens von Primärtumoren des Kolons, des Pankreas, der Mamma, des Magens, der Lunge und des Ösophagus (Kasper et al. 2005).

1.1.1 Maligne Primärtumoren der Leber

Hinsichtlich der Inzidenz maligner Primärtumoren der Leber liegt das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) mit einem Anteil von 70 bis 85 % an erster Stelle (Jemal et al. 2011). Mit deutlicher Häufung kommt es vorwiegend in Ost- und Südostasien sowie auf dem afrikanischen Kontinent vor (Jemal et al. 2011). Dort stellt es mit einer Inzidenz von 150 / 100.000 Einwohner sogar den häufigsten malignen Tumor des Mannes dar (Preuss 2012). Die Inzidenz ist ansteigend (Oyagbemi et al. 2010; Maluccio und Covey 2012). Eine Leberzirrhose jedweder Genese, Virushepatitiden, z. B. durch das Hepatitis B- und C-Virus, und die Steatosis Hepatis als Folge von erhöhtem Alkoholkonsum, Diabetes mellitus sowie das Metabolische Syndrom erhöhen das HCC-Risiko und sind Gründe für die steigende Inzidenz auch in den westlichen Ländern (Leitlinie Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms 2013).

Karzinome der Gallenwege (Cholangiokarzinome [CCC]) stehen mit 10-20% der primären Lebertumoren an zweiter Stelle. Weltweit machen sie 3% der gastrointestinalen Malignome aus (Shaib und El Serag 2004). 6-8% der CCC sind intrahepatisch gelegen, 50-67% liegen perihilar und 27-42% distal extrahepatisch (Brandi et al. 2016; Shaib und El-Serag 2004). Sie befinden sich aufgrund fehlender typischer Frühsymptome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in den meisten Fällen bereits in fortgeschrittenem Stadium und haben daher eine sehr schlechte Prognose (Brandi et al. 2016). Die Ätiologie ist bisher nicht sicher geklärt, die Risikofaktoren umfassen unter anderem die primär sklerosierende Cholangitis (PSC), parasitäre

Erkrankungen der Leber, insbesondere durch Leberegel, eine Hepatocholedocholithiasis, das Caroli-Syndrom mit Leberfibrose und Gallengangszysten sowie auch die kongenitale Leberfibrose allein. Auch Hepatitis B- und C-Infektionen, Leberzirrhose und toxische Leberschäden, z. B. durch Thorotrastapplikation, erhöhen das Erkrankungsrisiko (Brandi et al. 2016).

Andere maligne Primärtumoren in der Leber sind deutlich seltener und sollen deshalb hier nicht gesondert erörtert werden. Es handelt sich zum Beispiel um das fibrolamelläre Karzinom als Sonderform des HCC, das Hepatoblastom und das epitheloide Hämangioendotheliom. Diese Tumorentitäten haben zumeist eine bessere Prognose als das HCC (Dietel et al. 2003).

1.1.2 Maligne Sekundärtumoren in der Leber

Metastasen verschiedener solider Primärherde stellen mit über 95 % den weitaus größten Anteil der malignen Neoplasien in der Leber dar (Preuss 2012). Die Häufigkeit von Lebermetastasen ist in den USA etwa zwanzigmal so hoch wie die des HCC (Dietel et al. 2003). Bei der Autopsie von Patienten, die an einem Malignom verstorben sind, finden sich Lebermetastasen in 30 bis 50 % aller Fälle (Dietel et al. 2003). Die Organgröße, die hohe Durchblutung aus Pfortader und Arteria hepatica sowie lokale Gewebefaktoren machen die Leber – nach den Lymphknoten – zum zweithäufigsten Sitz von Metastasen, vor allem von Primärtumoren des Gastrointestinaltraktes, der Lunge, der Mamma und von Melanomen (Dietel et al. 2003).

1.2 Onkologische Therapiekonzepte primärer und sekundärer Lebertumoren

1.2.1 Primäre Lebertumoren

Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

Zur kurativen Behandlung des HCC gibt es drei grundlegende Therapieverfahren: Die chirurgische Resektion, die orthotope Lebertransplantation und die lokale Tumorablation. Das für den jeweiligen Patienten am besten geeignete Verfahren wird dabei unter Einbeziehung der individuellen Voraussetzungen gewählt. Dabei sind auch Kombinationen der einzelnen Verfahren in adjuvanter und neoadjuvanter Anwendung zum Downstaging oder zum Überbrücken der Wartezeit auf ein Spenderorgan möglich (Leitlinie Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms 2013).

Als Therapie der Wahl gilt die Leberteilresektion, gegebenenfalls kann bei zunächst nicht resektablen Befunden die Resektionsmöglichkeit durch neoadjuvante Anwendung eines interventionellen Verfahrens, wie z. B. der transarteriellen Chemoembolisation (TACE), erreicht werden (Leitlinie Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms 2013).

Bei nicht resektablen Befunden bietet die Lebertransplantation – insbesondere bei bestehender Zirrhose und sofern die Auswahlkriterien allgemein und hinsichtlich Tumorgröße und Tumoranzahl dieses Verfahren erlauben – eine Möglichkeit, das HCC und die häufig bestehende Lebergrunderkrankung zugleich zu therapieren (Maluccio und Covey 2012). Das Verfahren ist jedoch in erster Linie durch den Mangel an Spenderorganen limitiert. Bei weit fortgeschrittenem Tumorstadium, gekennzeichnet z. B. durch makrovaskuläre Infiltration, extrahepatische Tumorausdehnung oder Metastasierung, ist eine Transplantation nicht mehr indiziert (Maluccio und Covey 2012; Leitlinie Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms 2013).

Bei vielen Patienten handelt es sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aufgrund der Tumorgröße, -anzahl oder -lokalisation jedoch um nicht mehr resektable Befunde, oder es besteht eine durch andere Gründe, wie z. B. Komorbiditäten, bedingte Inoperabilität (Berber et al. 2013; Liu et al. 2013). Wenn in einem solchen Fall auch eine Lebertransplantation nicht möglich ist (s.o.), existieren zahlreiche minimalinvasive, lokal ablativ Verfahren, die dann teils konkurrierend, teils komplementär eingesetzt werden können. Dabei handelt es sich z. B. um die Radiofrequenzablation (RFA) (Nishikawa et al. 2013), die perkutane Mikrowellenablation (MWA), die Laserablation (LA) und *High Intensity Focused Ultrasound* (HIFU) (Goldberg und Ahmed 2002). Durch die besondere Blutversorgung der Leber, welche durch die Vena portae und die Arteria hepatica gewährleistet wird, ergeben sich zudem als weitere lokale, nichtoperative Verfahren katheterbasierte Techniken, wie z. B. die transarterielle Chemoembolisation - TACE (Stuart 2003), Radioembolisation, transarterielle Mikropartikel-embolisation und die intraarterielle Chemoinfusion. Vergleichende Daten der Verfahren untereinander und im Vergleich zur Resektion als Goldstandard im Sinne großer randomisierter klinischer Phase-III-Studien liegen jedoch nicht vor. (Goldberg und Ahmed 2002; Stuart 2003; Nishikawa et al. 2013; Leitlinie Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms 2013).

Patienten mit Fernmetastasen des HCC ohne Leberzirrhose bzw. mit Zirrhose im Stadium Child-Pugh A, die nicht suffizient lokoregionär behandelt werden können, aber noch eine Lebenserwartung von mehr als drei Monaten haben, profitieren von einer palliativen, systemi-

schen Chemotherapie (Leitlinie Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms 2013).

Cholangiokarzinom (CCC)

Die Inzidenz des CCC ist steigend, die Metastasen- und Rezidivrate hoch. Lediglich etwa 30% der Patienten können durch chirurgische Resektion behandelt werden. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt zwischen 25 und 40% (Rauchfuß und Settmacher 2015). Die einzige Therapieoption des CCC mit kurativem Ansatz ist die chirurgische Resektion (Brandi et al. 2016). Abhängig vom Vorliegen eines Ikterus ist im palliativen Setting ggf. eine Entlastung der Gallenwege z. B. durch Stenteinlage oder durch perkutane, transhepatische biliäre Drainage (PTBD) möglich. Diese Verfahren bergen allerdings Risiken wie septische Komplikationen oder Impfmetastasen im Stichkanal (Brandi et al. 2016). Verfahren wie die präoperative Portalvenenembolisation (PVE) des tumortragenden Lappens können die Funktion der verbleibenden Restleber verbessern und z. T. dadurch erst die Möglichkeit der Operation eröffnen. Eine adjuvante Chemotherapie verbessert die loko-regionäre Kontrolle nach R0- oder R1-Resektion (Brandi et al. 2016).

In selteneren Fällen von inoperablen Tumoren, bedingt durch komplexen Bezug zu Gefäßen oder Gallengängen kann - in Abwesenheit von Metastasen und bei gutem Allgemeinzustand des Patienten - auch eine orthotope Lebertransplantation erwogen werden (Brandi et al. 2016).

Insbesondere bei inoperablen Befunden und bei Rezidiven mit nicht ausreichender Funktionsreserve der Restleber wird wie beim HCC - abhängig von Tumorgröße und -lokalisation - auch die RFA durchgeführt, darüber hinaus haben auch andere lokale Verfahren wie Hepatic Arterial Infusion (HAI), TACE und Drug Eluting Bead TACE (DEB-TACE) einen Stellenwert (Brandi et al. 2016).

In Fällen, in denen eine Resektion nicht möglich ist, oder bei Fernmetastasierung wird zur Durchführung einer palliativen Chemotherapie geraten (Brandi et al. 2016).

1.2.2 Sekundäre Lebertumoren

Bei solitärer oder Oligometastasierung im Bereich der Leber ist der Goldstandard die Resektion im Gesunden. Limitierend ist auch hier die Funktionsreserve der Restleber, die durch Verfahren wie die Portalvenenembolisation und parenchymschonende Operationstechniken optimiert werden kann (Settmacher et al. 2014; Blackham et al. 2014). Durch eine präoperative

Chemotherapie kann bei inoperablen Befunden ggf. eine Operabilität erreicht werden (Clancy und Meyerhardt 2013).

Lokale Ablationsverfahren, wie RFA, MWA und LA, sind etablierte Alternativen zur Resektion, z. B. bei eingeschränkten Operationsmöglichkeiten, und können in bestimmten Fällen auch durch katheterbasierte Techniken, wie TACE oder HAI, ergänzt werden (Vogl et al. 2013; Grundmann et al. 2008).

Bei multipler Metastasierung ist der Goldstandard in Abhängigkeit vom Primärtumor häufig eine palliative Chemotherapie (Grundmann et al. 2008).

1.2.3 Die Rolle der Strahlentherapie bei der Behandlung primärer und sekundärer Lebertumoren sowie anderer maligner Oberbauchtumoren

Primäre und sekundäre Lebertumoren

Die Radiotherapie ist neben der Operation und der medikamentösen Tumorthherapie in der Onkologie die dritte wesentliche therapeutische Option. Die Bestrahlung maligner Prozesse in der Leber und in Lebernähe mit hoher und damit effektiver Strahlendosis hat bisher allerdings noch eine eingeschränkte klinische Bedeutung, da die Sensibilität der Leber gegenüber ionisierenden Strahlen deren Anwendung dadurch limitiert, dass das Auftreten einer strahleninduzierten Leberschädigung (*radiation-induced liver disease* - RILD) gefürchtet wird (Dawson et al. 2002; Rühl et al. 2010).

Durch die Etablierung neuer, moderner Methoden der Hochpräzisionsbestrahlung – wie der stereotaktisch geführten Perkutanbestrahlung oder der interstitiellen Brachytherapie – ist es allerdings immer besser möglich, das den Tumor umgebende gesunde Lebergewebe im Rahmen einer Bestrahlung zu schonen und damit das Risiko für das Auftreten einer RILD zu minimieren. In diesem Zusammenhang wurden in den letzten Jahren auch vermehrt Arbeiten zum Einsatz sowohl der perkutanen stereotaktisch geführten Bestrahlung als auch der interstitiellen Brachytherapie bei der Behandlung des HCC oder CCC oder auch Lebermetastasen publiziert. Diese Verfahren finden aktuell vor allem bei inoperablen Tumoren Anwendung, bei primären Lebertumoren ohne Fernmetastasen durchaus mit dem Ziel der Kuration, bei Metastasen mit dem Primärziel der loko-regionären Tumorkontrolle (Tanguturi et al. 2014; Hass und Mohnike 2014; Aitken und Hawkins 2015; Colletini et al. 2014). Randomisierte Phase-III-Studien zum Vergleich der genannten strahlentherapeutischen Verfahren mit anderen lokal-ablativen Verfahren (s.o. Kapitel 1.2) liegen nicht vor. Nach den vorliegenden Pub-

likationen erscheint die Strahlentherapie aber durchaus eine Alternative zu den etablierten Behandlungsmethoden mit zumindest guten lokalen Kontrollraten zu sein.

Auch in der Nuklearmedizin gibt es Ansätze zur Behandlung primärer und sekundärer Lebertumoren, z. B. mittels selektiver interner Radiotherapie (SIRT). Dieses Verfahren nutzt die besondere Blutversorgung der Leber, bei der das gesunde Lebergewebe zu ca. 80% durch das Blut der Pfortader versorgt wird und etwa zu 20% durch das Blut der Arteria hepatica. Lebertumoren > 3 mm beziehen ihre Blutversorgung dagegen vornehmlich aus der Arteria hepatica und nur zu einem geringen Anteil aus dem Pfortaderblut. Durch eine arterielle Einschwemmung von ⁹⁰Yttrium-beladenen Mikrosphären kann so eine weitgehend selektive, interne Bestrahlung des Tumorgewebes durch diesen Betastrahler erfolgen, bei gleichzeitiger Schonung des umliegenden gesunden Lebergewebes (Duan und Hoffmann 2015). Die SIRT hat daher auch Eingang in die Leitlinien zur Therapie von Lebertumoren gefunden (DGN-Handlungsempfehlung SIRT maligner Lebertumoren 2014; Leitlinie Kolorektales Karzinom 2013). Auch hier ist allerdings im klinischen Alltag die Strahlenempfindlichkeit der Leber zu beachten (Moir et al. 2015).

Magenkarzinom

Maligne Magentumoren sind größtenteils Adenokarzinome und kommen vorwiegend in asiatischen Ländern sowie Chile und Irland gehäuft vor (Dietel et al. 2003). Sie sind eine der häufigsten tumorbedingten Todesursachen weltweit. In Deutschland belegt das Magenkarzinom Rang 5 bzw. 6 in der Häufigkeit der Krebserkrankungen bei Männern bzw. bei Frauen (Leitlinie Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs 2012). Die empfohlene kurative Therapie ist die chirurgische Resektion, Tumoren, die auf die Mukosa beschränkt sind, können dabei auch endoskopisch reseziert werden (Leitlinie Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs 2012).

Zur Verbesserung der Prognose wird bei lokal fortgeschrittenen Stadien eine perioperative Chemotherapie empfohlen (Cunningham et al. 2006). Bei nicht durchgeführter präoperativer Chemotherapie kann zur Verbesserung der Prognose eine postoperative adjuvante Radiochemotherapie erfolgen (Smalley et al. 2012), insbesondere nach lediglich durchgeführter D1-Lymphknotendisektion. Ob eine adjuvante Radiochemotherapie zumindest in bestimmten klinischen Situationen auch nach D2- oder gar D3-Lymphknotendisektion einen Vorteil bringt, ist derzeit umstritten und muss im Rahmen kontrollierter klinischer Studien geklärt werden (Leitlinie Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und

ösophagogastralen Übergangs 2012).

Pankreaskarzinom

92% der Tumoren des Pankreas zählen zum duktalem Adenokarzinom. Aufgrund der Tatsache, dass Neoplasien des Pankreas in frühen Stadien häufig keine Schmerzen verursachen, wird die Diagnose oftmals erst in späten Stadien gestellt, mit entsprechend schlechter Prognose (Klöppel 2011). Die mittlere Überlebenszeit nach Erstdiagnose beträgt durchschnittlich 5 - 8 Monate. Bei der Neuerkrankungsrate in Deutschland liegt das Pankreaskarzinom auf dem neunten Platz bei Männern und auf Platz sieben bei den Frauen. Die Mortalitätsrate liegt nahe bei der Neuerkrankungsrate, was auf die niedrigste Überlebensrate aller Krebserkrankungen in Deutschland hinweist (Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2013).

Auch beim Pankreaskarzinom gilt die Resektion als derzeit einzige empfohlene kurative Methode. Ziel ist eine R0-Resektion (Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2013). Nach Operation und anschließender adjuvanter Chemotherapie können im Idealfall 5-Jahres-Überlebensraten von 18 – 25 % erreicht werden (Holzman 2010). Die Anwendung neoadjuvanter, definitiver und adjuvanter radio(chemo)therapeutischer Konzepte wird aufgrund der geringen und uneinheitlichen Daten diesbezüglich kontrovers diskutiert und hat dementsprechend – trotz vielversprechender zumindest Phase II-Daten (Brunner et al. 2007; Hurt et al. 2015; Van Laethem et al. 2010) – bisher noch keinen Eingang in die aktuellen Leitlinien zur Behandlung des Pankreaskarzinoms gefunden (Rajagopalan et al. 2013; Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom 2013).

Gastrointestinale Lymphome

Maligne extranodale Lymphome machen etwa 40 % der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) aus. Dabei sind die extranodalen Lymphome in erster Linie im Abdominalbereich lokalisiert, wobei Magenlymphome dabei etwa 70% ausmachen (Selçukbiricik et al. 2012). Wie bei den Non-Hodgkin-Lymphomen anderer Lokalisationen werden auch die gastrointestinalen Lymphome in der Regel mit einer Kombination aus System- sowie Strahlentherapie kurativ behandelt. Die Sequenz und Anwendung dieser beiden Therapiemodalitäten ergibt sich in üblicher Weise nach Malignitätsgrad (hoch- vs. niedrig-maligne) sowie Stadien-abhängig. Häufig werden Patienten/-innen mit Magenlymphomen innerhalb oder analog der sogenannten „Münsteraner Studie“ interdisziplinär multimodal behandelt (siehe auch <http://www.lymphome.de/Gruppen/DSGL/Protokolle/DSGL-01-2003/Intern/Protokoll-Magenlymphome.pdf>).

1.3 Radiation-Induced Liver Disease (RILD)

1.3.1 Klinik, Therapie, Histopathologie und Risikofaktoren

Wird gesundes Lebergewebe *in vivo* ionisierender Strahlung ausgesetzt kann es – abhängig von der applizierten Dosis und dem bestrahlten Organvolumen – zur Ausbildung der Strahleninduzierten Leberschädigung (*radiation-induced liver disease* - RILD) kommen (Dawson et al. 2002).

Klinisch präsentiert sich die akute Phase der RILD etwa zwei Wochen bis vier Monate nach der Bestrahlung durch die Erhöhung der alkalischen Phosphatase (vor allem im Vergleich mit den anderen Leberwerten), Abgeschlagenheit, Aszites und anikterischer Hepatomegalie unterschiedlicher Ausprägung. Leberfunktion, Bilirubin und Ammoniak bleiben zunächst unauffällig. Bei Patienten mit bestehender chronischer Lebererkrankung kann sich auch ein anderes klinisches Bild zeigen, mit Ikterus und deutlicher Transaminasenerhöhung (Ingold et al. 1965; Guha und Kavanagh 2011). In der Folge entwickelt sich histologisch das Bild einer venösen Verschlusskrankheit der Leber (*veno-occlusive Disease*, VOD). Dabei kommt es zu einem hypoxischem Untergang von Lebergewebe, es resultiert ein fibrotischer Umbau, der in eine Zirrhose münden kann (Guha und Kavangah 2011; Reed und Cox 1966). Abhängig vom Ausmaß der Schädigung kommt es zu leichten, asymptomatischen Verläufen mit kompletter Remission, zu mittelschweren Verläufen mit Teilremission und ausreichender Funktionsreserve oder auch zu schweren Verläufen mit Leberversagen und letalem Ausgang (Guha und Kavangah 2011; Wadleigh et al. 2003).

Eine kausale Therapie der RILD ist bisher nicht bekannt. Die Behandlung beschränkt sich auf die symptomatische Therapie mit Analgetika, Diuretika und Flüssigkeitsrestriktion, Drainage des Aszites, Ausgleich einer Gerinnungsstörung und Steroiden (Guha und Kavangah 2011). Der Versuch einer Lyse-Therapie mit rekombinantem Gewebeplasminogenaktivator (r-tPA) und Heparin brachte zwar geringe Erfolge, ging aber auch mit vital bedrohlichen Blutungskomplikationen einher (Bearman et al. 1997).

Reed und Cox untersuchten 1966 humane Leberproben vor und nach Bestrahlung im Rahmen von Lebermetastasen, Lymphomen und lebernahen Ösophaguskarzinomen. Die Proben wurden durch perkutane und offene Biopsie, sowie nach Autopsien gewonnen (Reed und Cox 1966). Histologische Untersuchungen zeigten einen Verschluss des peripheren venösen Abfluss-Systems als histopathologisches Korrelat, dabei ergibt sich ein gemischtes Bild ver-

schlossener, fibrosierter venöser Gefäße und durchgängiger Kollateralen, welches dem einer veno-okklusiven Erkrankung (*veno-occlusive Disease, VOD*) entspricht (Reed und Cox 1966). Das Bild einer VOD kommt dabei vor allem bei multimodalen Therapien bestehend aus (Hochdosis-)Chemotherapie und Bestrahlung vor (Shim et al. 2007).

Bezüglich des Auftretens der strahleninduzierten Leberschädigung besteht ein deutlicher Dosis-Volumen-Effekt: Nach fraktionierter Ganzleberbestrahlung mit maximal 31 Gy bzw. 2/3 des Organvolumens mit 47 Gy oder 1/3 des Organvolumens mit 90 Gy beträgt das Risiko für das Auftreten $\leq 5\%$ (Dawson et al. 2001). Weitere Risikofaktoren sind höheres Lebensalter, eine Vorschädigung der Leber, z. B. im Sinne einer Leberzirrhose, eine gleichzeitige Chemo- oder Immuntherapie sowie Infektionen wie z. B. Virushepatitiden (Dawson et al. 2002; Cheng et al. 2004; Jung et al. 2013).

1.3.2 Bisherige experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese und Vergleich mit anderen strahleninduzierten Organschäden sowie anderen toxischen Leberschäden

Der genaue Pathomechanismus der RILD ist bisher ungeklärt. Trotz der klinischen Beobachtungen, dass die Leber ein relativ strahlensensibles Organ ist (s.o.), zeigten erste experimentelle *in vitro*-Untersuchungen an primären Hepatozyten der Arbeitsgruppe Jirtle et al., dass die Hepatozyten zumindest *in vitro* im Gegensatz zu den klinischen Beobachtungen relativ strahlenresistent sind (Jirtle et al. 1984; Alati et al. 1988; Jirtle et al. 1990). Im experimentellen Tiermodell konnte die Arbeitsgruppe von Geraci et al. die Strahlenempfindlichkeit des Organs allerdings nachvollziehen, es zeigten sich histopathologische Veränderungen, die denen beim Menschen vergleichbar waren (Geraci et al. 1985b; Geraci et al. 1992; Geraci und Mariano 1993).

Bei anderen akuten und chronischen strahleninduzierten Organschäden konnte bereits gezeigt werden, dass bei der Pathogenese Zell-Zell-Interaktionen über Zytokine eine wesentliche Rolle zu spielen scheinen, so zum Beispiel bei der strahleninduzierten Schädigungen im Bereich der Lunge (Rübe et al. 2005), des Darmes (Ong et al. 2010; Liu et al. 2015) oder des Gehirns (Yoritsune et al. 2014). Auch bei der Pathogenese anderer toxischer Leberschädigungen wie z. B. durch Ethanol, Azetaldehyd oder Acetaminophen (Paracetamol) sind Zytokin-vermittelte Interaktionen beschrieben worden (Xie et al. 2014). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass auch bei der Pathogenese der strahleninduzierten Leberschädigung Zell-Zell-Interaktionen der verschiedenen Zellsysteme der Leber über Zytokine beteiligt sind. Erste *in vitro*-Ergebnisse

der eigenen Arbeitsgruppe bestätigen diese Hypothese (Christiansen et al. 2004): Es wurden sowohl Hepatozyten als auch Lebermakrophagen *in vitro* bestrahlt. In den Zellkulturüberständen der Lebermakrophagen fand sich eine strahleninduzierte Erhöhung der TNF-alpha-Konzentration. Eine alleinige Bestrahlung führte nicht zu einem Anstieg der Apoptose-Rate der Hepatozyten, ebensowenig wie eine alleinige Inkubation mit den Zellkulturüberständen der bestrahlten Lebermakrophagen. Waren die Hepatozyten allerdings sowohl der Bestrahlung als auch den Zellkulturüberständen ausgesetzt, so konnte ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate gemessen werden (Christiansen et al. 2004).

1.3.3 Ziel der Arbeit

Aufgrund der geschilderten *in vitro*-Ergebnisse der Arbeitsgruppe erhärtet sich der Verdacht, dass möglicherweise Zell-Zell-Interaktionen über Zytokine eine wesentliche Rolle in der Frühphase der Pathogenese der strahleninduzierten Leberschädigung spielen. Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Hypothese zu überprüfen, dass es auch in einem experimentellen Tiermodell *in vivo* nach selektiver Ganzleberbestrahlung sowohl auf RNA- wie auch auf Proteinebene zu einem signifikanten Anstieg der Expression ausgewählter Zytokine kommt. Dazu wird zunächst eine selektive, CT-geplante Ganzleberbestrahlung im Tiermodell durchgeführt. Durch die CT-geplante, selektive, nicht invasive Leberbestrahlung können dabei störende Effekte der Bestrahlung auf andere Organe weitestgehend ausgeschlossen werden. Zu definierten Zeitpunkten innerhalb von 48 Stunden nach Bestrahlung wird sowohl Leberwebe als auch Serum der behandelten Tiere sowie auch unbestrahlter Kontrollen asserviert und auf die Expression definierter Zytokine auf RNA- (Real-Time PCR) wie auch Proteinebene (ELISA, Western Blot) untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Computertomograph	Somatom Balance (Siemens, Erlangen, Deutschland)
Beschleuniger	Clinac 600C (Varian, Palo Alto, USA)
Pipetten	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl, Multichannel 200 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Magnetrührer	(IKA, Staufen, Deutschland)
Umwälzpumpe	(Krannich, Göttingen, Deutschland)
Zentrifugen	Tischzentrifuge (Heraeus Instruments, Langenselbold, Deutschland) Ultrazentrifuge L8-70M (Beckmann, München, Deutschland) Rotor 50.1 SW (Beckmann, München, Deutschland)
Waage	(Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
Vortexer	(MS1 Minishaker, IKA, Staufen, Deutschland)
ELISA-Reader	(Dynatech MR 5000, Ashford, United Kingdom)
Thermocycler	(ABI Prism 7600, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
Sterile Werkbank	(Lamin Air, Heraeus, Hanau, Deutschland)
Taumler	(Kottermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Blotkammer	(Semi Dry Trans Blot SD, Bio-Rad, Hercules, USA)
Spannungsversorgung	(Power Pac 200, Power Pac 300, Bio-Rad, Hercules, USA)
Mixer	(Ultra Turrax, IKA, Staufen, Deutschland)
Photometer	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.1.2 Einwegmaterialien

Pipettenspitzen, steril	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Pipetten, steril	2 ml, 10 ml, 25 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsröhrchen, steril	500 µl Safelock, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Kunststoffröhrchen, steril	50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) 15 ml (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland)
Venenverweilkatheter, steril	20 G (Klinka Medical GmbH, Usingen, Deutschland)
Ultrazentrifugenröhrchen, steril	(Beckmann, München, Deutschland)
Einwegspritzen, steril	1 ml, 10 ml (Kendall, Neustadt/Donau, Deutschland)
Einwegskalpell, steril	(Feather, Osaka, Japan)
Mullkomresse, steril	(Lohmann und Rauscher, Neuwied, Deutschland)
Elektrophoresegelkassetten	(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Wardman-Filterpapier	(Bio-Rad, Hercules, USA)
96-Loch Reaktionsplatten	(Nunc, Roskilde, Dänemark)

2.1.3 Antikörper

TNF- α -AK:	Anti-rat TNF- α Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstedt, Deutschland)
IL-1 β -AK:	Anti-rat IL-1 β -Antikörper (Strathmann Biotec AG, Hamburg, Deutschland)
IL-6-AK:	Anti-rat IL-6-Antikörper (PeproTech Inc., New Jersey, USA)
Sekundärantikörper	(Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)

2.1.4 Primer

Sämtliche Primer wurden von MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland hergestellt.

Ubiquitin forward	5'-CACCAAGAAGGTCAAACAGGAA-3'
Ubiquitin reverse	5'-AAGACACCTCCCCATCAAACC-3'
β-Actin forward	5'-GAAATCGTGCGTGACATTAAAGAG-3'
β-Actin reverse	5'-GCGGCAGTGGCCATCTC-3'
TNF-α forward	5'-ACAAGTCTGCCCCGACTAT-3'
TNF-α reverse	5'-CTCCTGGTATGAAGTGGCAAATC-3'
IL-1β forward	5'-TACCTATGTCTTGCCCGTGGAG-3'
IL-1β reverse	5'-ATCATCCCACGAGTCACAGAGG-3'
IL-6 forward	5'-GTCAACTCCATCTGCCCTTCAG-3'
IL-6 reverse	5'-GGCAGTGGCTGTCAACAACAT-3'

2.1.5 Medikamente

Narcoren (Phenobarbital-Natrium; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland)

Hostaket (Ketaminhydrochlorid; Intervet, Unterschleißheim, Deutschland)

Xylazin (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg/Saale, Deutschland)

2.1.6 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit Ampuva (Fesenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) angesetzt.

NP-40 Lysis Puffer (zur Proteinisolation):

150 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)

1 % NP-40 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

50 mM Tris HCL (Paesel und Lorei, Frankfurt, Deutschland)

pH 8,0 mit 1M NaOH eingestellt (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Laufpuffer für Western Blot:

50 ml NuPage Mops SDS Running (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

950 ml H₂O (eigene Herstellung)

Transferpuffer für Western Blot

50 ml NuPage Transfer Puffer (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

950 ml H₂O (eigene Herstellung)

Caesiumchlorid-Lösung (RNA-Isolation):

5,7 M Caesiumchlorid (Biochrom/Merck, Darmstadt, Deutschland)

0,25 M Natriumcitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

0,25 M EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

TBS (TRIS buffered saline); (Paesel und Lorei, Frankfurt, Deutschland)

Tween 20 Waschlösung (für Western Blot):

TBS (TRIS buffered saline); (Paesel und Lorei, Frankfurt, Deutschland)

0,5 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Blockierungsmilch 5 % (für Western Blot):

TBS (TRIS buffered saline; Paesel und Lorei, Frankfurt, Deutschland)

5 % Magermilchpulver (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Lösungen:

Rainbow Marker Full Range (Amersham Biosciences)

2.1.7 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden – sofern nicht anders angegeben – von den Firmen Böhlinger Mannheim (Mannheim, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Gibco BRL (Bern, Schweiz), und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Ampuva (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland)

Aqua bidest (im eigenen Labor hergestellt)

Caesiumchlorid (Biochrom/Merck, Darmstadt, Deutschland)

Dithiothreitol (Sigma)
Ethanol (Merck)
Guanidinisothiocyanat (Gibco)
HEPES sodium salt (Sigma)
Mercaptoethanol (Sigma)
Natriumcitrat (Sigma)
Natriumacetat (Sigma)
Ponceau S (Sigma)
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate) (Sigma)

2.1.8 Laborkits

Quantikine Rat TNF- α Immunoassay	Katalognummer RTA00 (RnD Systems GmbH Wiesbaden-Nordenstedt, Deutschland)
Quantikine Rat IL-1 β Immunoassay	Katalognummer RLB00 (RnD Systems GmbH Wiesbaden-Nordenstedt, Deutschland)
Quantikine Rat IL-6 Immunoassay	Katalognummer R6000B (RnD Systems GmbH Wiesbaden-Nordenstedt, Deutschland)
DC Protein Assay-Kit	(Bio-Rad, Hercules, USA)
SuperScript III Reverse Transcriptase Kit	(Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG	(Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

2.1.9 Versuchstiere

Die Verwendung von Versuchstieren, deren Haltung sowie die vorliegende Studie wurden von der Ethikkommission und dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit geprüft und genehmigt (Aktenzeichen 509.42502/01-09.03).

Verwendet wurden männliche Wistar-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland) mit einem Lebendgewicht von 180 bis 200 g. Die Ratten wurden unter pathogenfreien Bedingungen im Tierstall der medizinischen Fakultät der Universität Göttingen gehalten. Sie erhiel-

ten Futter und Trinkwasser ad libitum und einen hell-dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden.

Die Richtlinien und Grundsätze zu Haltung und Gebrauch von Labortieren wurden eingehalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeitsprogramm

Nach selektiver Leberbestrahlung wurden die bestrahlten Tiere sowie unbestrahlte Kontrollen eine, drei, sechs, zwölf, 24 und 48 Stunden nach der Bestrahlung getötet und die gesamte Leber sowie das Blutserum asserviert. Im Serum sowie im Lebergewebe wurde anschließend die Expression der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β zu den genannten Zeitpunkten sowohl auf RNA- (Real-Time PCR) sowie auf Proteinebene (ELISA, Western Blot) bestimmt und in Relation zu unbestrahlten Kontrollen quantitativ (Real-Time PCR, ELISA) erfasst.

2.2.2 Bestrahlung

Im Tierversuch wurden die Lebern der Tiere *in vivo* unter Narkose (intraperitoneale Injektion von 90 mg/kg KG Ketamin und 7,5 mg/kg KG Xylazin) mittels abdominaler Computertomographie dargestellt. Anschließend wurden auf der Grundlage der Computertomographie die Organgrenzen der Leber auf dem Tier markiert und damit das Bestrahlungsfeld definiert. Anschließend wurde eine Dosisverteilung errechnet – analog zum Vorgehen bei einer 3D-konformalen Strahlentherapie beim Menschen. Schließlich wurde die Leber einzeitig mit einer Dosis von 25 Gy selektiv perkutan mit einer a-p/p-a-Technik mit 6 MV Photonen und einer Dosisrate von 2,4 Gy/min bestrahlt (siehe auch Christiansen et al. 2006).

2.2.3 Gewinnung von Serum und Lebergewebe

Eine, drei, sechs, zwölf, 24 und 48 Stunden nach der Bestrahlung wurden jeweils Vollblut zur Serumgewinnung sowie die gesamte Leber entnommen und alle Proben nach Aliquotierung umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden anschließend bei -80°C gelagert.

Zur Gewinnung der Proben wurden dem jeweiligen Tier 0,5 ml (= 80 mg) Phenobarbital-Natrium (Narcoren; entsprechend 400 mg/kg KG) intraperitoneal injiziert. Nach dem Erlöschen der Schutzreflexe erfolgte die Fixierung der Ratte in Rückenlage, die Bauchdecke wurde mit Ethanol benetzt. Die Bauchdecke und das Peritoneum wurden mit einer Schere median und mit Entlastungsschnitten nach lateral am kranialen und am kaudalen Zugangsende eröffnet und der dadurch freigelegte Darm zur rechten Seite mobilisiert, um Zugang zur Leber und

zur Vena cava inferior zu erhalten. Zunächst wurde nun die V. cava inferior mit einem 20 G Venenverweilkatheter kanüliert und das gesamte Blutvolumen von ca. 10 ml entnommen. Zum Entfernen der zellulären Bestandteile und der Gerinnungsfaktoren des so gewonnenen Vollblutes wurden die Proben zwei Stunden lang bei Raumtemperatur zur Koagulation gelagert und anschließend 20 min. bei 4°C und 1.000 g zentrifugiert. Dann wurde das so gewonnene Serum abpipettiert und in Aliquots von 120 µl bei -80°C eingefroren.

Zur Gewinnung des Lebergewebes wurde die Vena portae mit einem weiteren 20 G Katheter punktiert und die Leber zum Entfernen des restlichen Blutes nach Durchtrennung der V. cava inferior mit 50 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült. Die regelrechte Spülung wurde hierbei durch eine deutliche, makroskopisch sichtbare Entfärbung der gesamten Leber sichtbar.

Zu- und abführende Gefäße, der Gallengang und die bindegewebigen Anhänge wurden lebernah durchtrennt und die Leber in toto entnommen. Vor dem Einfrieren wurde das gesamte Organ auf steriler Gaze mit einem sterilen Einwegskalpell in Quader von ca. 0,1 ml Volumen zerkleinert.

Der restliche Tierkadaver wurde vorschriftsmäßig entsorgt.

2.2.4 Herstellung eines Homogenisates aus dem Lebergewebe

Das Lebergewebe wurde mit einem sterilen Einwegskalpell auf steriler Gaze zunächst fein zerkleinert. Anschließend erfolgte ein weiteres Zerkleinern der Stücke mit dem Turrax Homogenisator in NP-40-Lysis-Puffer, bis die Flüssigkeit keine Gewebestücke mehr aufwies. Zuletzt wurden die Zellwände mit Ultraschall bei mittlerer Intensität zertrümmert. Das so gewonnene Homogenisat wurde erneut aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C aufbewahrt.

2.2.5 Real-Time PCR (RT PCR)

Die Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT PCR) stellt ein geeignetes und etabliertes Verfahren zur Quantifizierung der Proteinbiosynthese auf der Ebene der Aktivierung bestimmter Gensequenzen dar.

2.2.5.1 Prinzip der Real-Time PCR

Bei der RT PCR handelt es sich um eine Methode, die auf der Basis der konventionellen Polymerase-Chain-Reaction (PCR) beruht. Hierbei werden die gesuchten DNA-Abschnitte

(Target-DNA) einer DNA-haltigen Probe in einem automatisierten Verfahren gezielt vervielfältigt. Die zu untersuchende DNA wird dazu zusammen mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase (taq-Polymerase, aus dem thermophilen, gramnegativen Bakterium *Thermus aquaticus*), ausreichend Nukleotiden und dem für die zu vervielfältigende Sequenz spezifischen Primer zyklisch über die Schmelztemperatur der DNA hinaus erhitzt und wieder abgekühlt. Oberhalb der Schmelztemperatur dissoziiert die Doppelstrang-DNA, wodurch der spezifische Primer an die entsprechende Target-DNA-Sequenz binden kann. Beim anschließenden Abkühlen wird dann – in Anwesenheit der benötigten Nukleotide – der jeweilige Komplementärstrang der Target-DNA in ausreichender Menge durch die taq-Polymerase synthetisiert. Auf diese Weise verdoppelt sich die Menge der gesuchten Sequenz bei jedem Zyklus. Durch das Einbringen geeigneter, interkalierender Fluoreszenz-DNA-Farbstoffe in diese Reaktion, wie z. B. SYBR-Green, lässt sich die Anwesenheit der gesuchten Sequenz nach jedem einzelnen Zyklus durch eine Fluoreszenzmessung in Echtzeit (Realtime) detektieren. Als Messgröße dient dabei der sogenannte CT-Wert (*threshold-cycle*), d.h., dass die Anzahl der Zyklen gemessen wird, die absolviert werden muss, um einen definierten Fluoreszenz-Schwellenwert der Messung zu überschreiten. Der CT-Wert verhält sich demnach indirekt proportional zur Ausgangsmenge der Target-DNA. D. h., je weniger der gesuchten Target-DNA in der zu untersuchenden Probe vorhanden ist, desto mehr Zyklen der Reaktion müssen ablaufen, damit der Fluoreszenzgrenzwert erreicht wird. Als Referenzgröße dient die Amplifikation des DNA-Abschnittes eines sogenannten Housekeeping-Gens, das für ein Protein aus dem Strukturstoffwechsel der Zelle kodiert, dessen Expression von Störfaktoren, wie z. B. von ionisierender Strahlung, weitestgehend unbeeinflusst und somit konstant bleibt. Als Housekeeping-Gen diente in den Messungen der vorliegenden Arbeit das Gen für Ubiquitin (Ubq). Die relative Expression der Target-DNA ließ sich auf diesem Weg im Verhältnis zur Expression des Ubq-Gens bestimmen. Die absolute Quantifizierung durch die Quantitative Real-Time PCR stellt ein sehr aufwendiges Verfahren dar und ist nur erschwert mit hinreichender Genauigkeit möglich (Pfaffl 2001). Um der vorliegenden Studie eine ausreichende Aussagekraft zu verleihen, war dieses Verfahren jedoch nicht erforderlich, da ausschließlich die relativen Expressionsunterschiede der Gene im Vergleich mit den unbestrahlten Kontrollen aufgezeigt werden sollten. Nach Beendigung der PCR ließ sich die Spezifität der Messung durch die Analyse einer Schmelzkurve bestätigen, die für jeden DNA-Abschnitt eine eigene Temperaturcharakteristik aufweist.

Da die Aktivierung der gesuchten Gene und die Synthese von mRNA durch das vermehrte Ablesen der entsprechenden DNA-Sequenzen erfolgt, die PCR jedoch wegen der Spezifität

der taq-Polymerase nur für DNA-Targets möglich ist, muss die synthetisierte mRNA isoliert und in einem zweiten Schritt in die amplifizierbare DNA umgeschrieben werden.

2.2.5.2 RNA-Isolierung für RT PCR

Die Isolierung der RNA wurde durch Ultrazentrifugierung über einen Cäsiumchloridgradienten durchgeführt (Chirgwin et al. 1979; Ramadori et al. 1985). Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter RNase- und DNase-freien Bedingungen auf Eis und unter der sterilen Werkbank durchgeführt.

Je 1 ml Organvolumen der Leber wurden in 3 ml Guanidin-Lösung mit dem Ultra-Turrax zerkleinert. Die Lösung wurde mehrmals durch eine sterile 22 G-Kanüle aufgezogen. In Ultrazentrifugenröhrchen wurden je 2 ml CsCl-Lösung vorgelegt und anschließend mit der Probe überschichtet. Fehlendes Volumen wurde mit Guanidin-Lösung auf eine Gewichts Differenz von < 10 mg aufgefüllt. Die Proben wurden in der evakuierten und auf 4° C gekühlten Ultrazentrifuge für 24 Stunden bei 100.000 g zentrifugiert. Die Zentrifuge lief dabei ohne Bremse aus. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und der Boden des Röhrchens mit einem sterilen Einwegskalpell abgetrennt. Die nun im Pellet konzentrierte RNA wurde zweimal mit je 200 µl 70 %igem Ethanol bei -20° C vorsichtig gewaschen und anschließend 15 Minuten lang luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 200 µl aqua bidest sorgfältig durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette resuspendiert und in E-Cups transferiert. Eventuell verbliebene makroskopische Verunreinigungen wurden durch zweiminütiges Zentrifugieren mit 15.000 g entfernt. Zur Präzipitation der RNA wurden 400 µl 100 %iges Ethanol und 20 µl Natriumacetat zugegeben. Anschließend wurde die Probe zwei Stunden lang bei -80° C gelagert.

2.2.5.3 Messen der RNA-Konzentration

Zur Messung der RNA-Konzentration der Proben wurden diese zunächst bei 4° C und 15.000 g 30 Minuten lang zentrifugiert und die 600 µl Überstand abpipettiert. Das zurückbleibende Pellet wurde unter der sterilen Werkbank luftgetrocknet und anschließend mit 50 µl aqua bidest durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette resuspendiert. Von dieser Suspension wurden je 5 µl zu 1 ml aqua bidest gegeben. Im Photometer wurde dann die optische Dichte (OD) durch Messung der Absorption bei 260 nm Wellenlänge – welche dem Absorptionsmaximum der RNA entspricht – gegen reines Wasser bestimmt. Die RNA-Konzentration der Proben wurde anschließend automatisch durch das entsprechend programmierte und kalibrierte Photometer (OD von 1 entspricht 40 µg RNA/ml) berechnet und in µg/µl ausgegeben. Es

erfolgte zudem die Messung der Reinheit der Proben durch Messung der Absorption durch Proteine (maximale Absorption bei 280 nm) und Bestimmung des Quotienten OD 260/OD 280 wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 als ausreichend rein angesehen wurde.

2.2.5.4 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Da die taq-Polymerase eine DNA–DNA-Polymerase ist und damit die isolierte RNA als Substrat nicht verarbeiten kann, musste die RNA zunächst mithilfe einer RNA–DNA-Polymerase, der reversen Transkriptase, wie sie z. B. aus Retroviren bekannt ist, in eine entsprechende DNA-Sequenz umgeschrieben werden. Die reverse Transkription wurde mit dem SuperScript III Reverse Transcriptase Kit von Invitrogen durchgeführt. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

In sterile E-Cups wurden 1 µl oligo(dT), 5 µg RNA und 1 µl 10 mM dNTP Mix mit aqua bidest auf ein Volumen von 13 µl aufgefüllt und anschließend fünf Minuten lang auf 65° C erhitzt. Danach folgte eine einminütige Inkubation auf Eis. Randständige Tropfen wurden kurz abzentrifugiert und 4 µl 5X First-Strand Buffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNaseOUT und 1 µl SuperScript III RT dazu pipettiert. Nach mehrmaligem Aufziehen durch die Pipette zur Durchmischung wurde der Ansatz bei 50° C für weitere 60 Minuten inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Temperatur für einen Zeitraum von 15 Minuten auf 70° C erhöht.

2.2.5.5 Durchführung der Real-Time PCR

Die Durchführung der RT PCR erfolgte nach Herstellerprotokoll: Zunächst Herstellung des Mastermixes aus dem Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG Kit nach Anleitung zur Minimierung von Pipettierfehlern. Hierfür wurden 13,5 µl Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG, 1,5 µl forward Primer und 1,5 µl reverse Primer des zu bestimmenden Zytokins sowie 6 µl Ampuwa angesetzt, multipliziert mit der Anzahl der jeweiligen cDNA Proben. Für jedes Zytokin wurde ein eigener Mastermix mit den jeweiligen Primern hergestellt. Auf einer 96-Loch-Mikroplatte wurden dann die einzelnen Reaktionskammern mit je 22,5 µl Mastermix für die einzelnen Zytokine sowie für Ubiquitin als Referenz beschickt. Dann wurden die cDNA-Proben anhand der zuvor ermittelten Konzentrationen mit Ampuwa auf eine Standardkonzentration von 0,01 µg/µl verdünnt. Hiervon wurden schließlich je 2,5 µl pro Messung in die oben genannte RT PCR eingebracht. Als Negativkontrolle diente eine Beschickung mit 2,5 µl Ampuwa.

Die Reaktionsplatte durchlief dann – nach vorsichtigem Mischen im Rüttler – folgendes Temperaturprogramm im Thermocycler:

2 Minuten bei 95,0° C

Danach 45 Zyklen:

15 Sekunden bei 95,0° C

30 Sekunden bei 60,0° C

Anschließend wurden die erhaltenen CT-Werte (threshold cycle) der Proben ($C_{t_{\text{target}}}$) mit dem Wert des Housekeeping-Gens Ubiquitin (CT_{UBQ}) nach folgender Formel korrigiert, um den Differenzwert (ΔCT) zu erhalten: $\Delta CT = C_{t_{\text{target}}} - CT_{\text{UBQ}}$

Die Konzentration (K) wurde anhand der vom Hersteller Applied Biosystems empfohlenen Formel errechnet: $K = 2^{-\Delta CT}$

Um die relative Veränderung zu den nicht bestrahlten Kontrollen zu verdeutlichen, wurde für diese der Wert 1 angenommen. Die Messwerte wurden als Produkt von 1 dargestellt.

2.2.6 Western Blot

Zur semiquantitativen Bestimmung der zu untersuchenden Zytokine mit Proteincharakter wurden mit den Proteinlösungen aus dem Lebergewebe der Ratten Western Blot-Untersuchungen durchgeführt. Dabei handelt es sich um die elektrophoretische Auftrennung eines Proteingemisches nach Größe und Ladung und die anschließende Sichtbarmachung der aufgetrennten Proteine mittels radioaktiv markierter, spezifischer Antikörper. Die Sichtbarmachung erfolgt hierbei durch Schwärzung eines Filmes durch die radioaktiven Antikörper, welche in ihrer Intensität daher von der Menge des zu detektierenden Proteins abhängig ist.

2.2.6.1 Prinzip des Western Blot

Zunächst werden identische Mengen von Proteingemisch aus den Gewebeproben nebeneinander in die Kammern auf der Schmalseite eines Polyacrylamidgelstreifens vorgelegt. Dieser befindet sich in einer Elektrophoresekammer und ist komplett mit Laufpuffer bedeckt. Durch Anlegen einer Gleichspannung an die Kammer in Längsrichtung des Gels werden die polaren Gruppen der Proteine in Richtung des jeweiligen elektrischen Gegenpols gezogen. Es resultiert eine Bewegung jedes Proteins durch die Poren des Polyacrylamidgels, die je nach Ladung und molekularer Größe des Proteins unterschiedlich schnell verläuft. Infolgedessen werden die Proteine nach Molekülgröße und Ladung aufgetrennt, wobei Proteine gleicher Größe und Ladung am Ende der Elektrophoresephase in Banden nebeneinander zu liegen kommen. Proteine mit kleiner Molekülgröße durchwandern die Poren des Gels bei gleicher elektrischer

Ladung dabei schneller und kommen zum Ende der Elektrophorese somit in weiterer Entfernung vom Ausgangsort zu liegen als größere Proteine. Ein Standard aus eingefärbten Proteinen bekannter Molekülgrößen erlaubt schließlich die Größenordnung und damit die Identifikation der Proteinproben. Nach dem Auflegen einer Membran aus Nitrozellulose auf den Gelblock und dem Anlegen einer Spannung senkrecht zum Gel werden die erhaltenen Proteinbanden anschließend auf diese Membran übertragen und dort durch hydrophobe Wechselwirkungen fixiert. Zur semiquantitativen Auswertung des gesuchten Proteins wird die Nitrozellulosemembran zunächst mit einem Antikörper gegen das entsprechende Protein inkubiert, dem sogenannten Primärantikörper. Unspezifische Bindungsstellen der Proteine wurden zuvor mit Blockierungsmilch inaktiviert. Nachdem locker oder unspezifisch gebundene Antikörper ausgewaschen wurden, fügt man zur Detektion des Primärantikörpers einen weiteren Antikörper (Sekundärantikörper) hinzu, welcher mit einem leicht radioaktiven Stoff markiert wurde und sich spezifisch gegen Epitope des Primärantikörpers richtet. Nicht gebundene Sekundärantikörper werden durch erneutes Waschen entfernt. Im Anschluss wird in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm auf die so vorbehandelte Membran aufgelegt. Der Grad der Schwärzung des Filmes, welche durch den radioaktiv markierten Sekundärantikörper auf der spezifischen Bande des zu untersuchenden Proteins verursacht wird, lässt eine Aussage über dessen relative Konzentration im Verhältnis zu den anderen Proben auf demselben Gel zu.

2.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Um die Proteinkonzentrationen der einzubringenden Proben zu bestimmen, wurde der DC Protein Assay Kit von Bio-Rad mit den mitgelieferten Reagenzien verwendet. Die Bestimmung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Dafür wurden die Proben zunächst 1:10 mit Ampuwa verdünnt, um den Messbereich der Proteinstandards (max. 1,44 g/l) einzuhalten. Je 20 µl der Probe und der Proteinstandards wurden in ein E-Cup pipettiert. Danach wurden 100 µl der Lösung A (+ 10 % SDS) zugegeben, anschließend 900 µl der Lösung B. Proben und Standards wurden gevortext und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion der Proben bei 750 nm wurde innerhalb einer Stunde im Photometer gemessen.

Der Proteingehalt der Proben wurde mithilfe einer zuvor erstellten Standardkurve bestimmt: Die Extinktion wurde gegen die jeweilige Konzentration der Standardverdünnungsreihe aufgetragen und anschließend die Funktion einer Ausgleichsgerade berechnet.

2.2.6.3 Durchführung des Western Blot

Die Proteinlysate wurden mit Aqua bidest auf identische Konzentrationen verdünnt. Der NuPage LDS Probenpuffer wurde 1:5 mit DTT verdünnt. Je 10 µl verdünnter Probenpuffer und 10 µl Proteinprobe wurden zusammen mit 150 µg Protein in ein E-Cup pipettiert. Die Proben wurden zunächst eine Minute lang bei 13.000 U/min zentrifugiert und dann zehn Minuten lang bei 70° C denaturiert. Danach wurden die E-Cups eine Minute lang auf Eis abgekühlt, eine weitere Minute mit 13.000 U/min zentrifugiert und anschließend auf Eis gelagert.

Die Elektrophoresegelkassette wurde vorsichtig aus der Verpackung entnommen, kurz mit Wasser gespült und in die Elektrophoresekammer eingebracht. Die Kammer wurde mit Laufpuffer befüllt bis das Gel vollständig bedeckt war. Danach wurde der Kamm aus den Gelkammern entfernt. Jetzt wurden die zu untersuchenden Proben sowie 5 µl Rainbow Marker in die Gelkammern pipettiert und die Elektrophorese bei 150 V für ca. eine bis anderthalb Stunden gestartet, bis die ersten Banden den Unterrand des Gels erreichten.

Die Spannung wurde ausgeschaltet und das Gel vorsichtig aus der Gelkassette entnommen. Überstehende Reste wurden vom Gel abgetrennt, danach wurde dieses auf ein passend zugeschnittenes Stück Wardman-Papier aufgelegt. Auf das Gel wurde anschließend ein entsprechend großes Stück Nitrozellulosemembran und ein weiteres Stück Wardman-Papier gleicher Größe möglichst luftblasenfrei aufgebracht. Eventuell noch vorhandene Luftblasen wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig ausgestrichen. Das so vorbereitete Gel wurde zwischen zwei Schwämmen in die Blotkammer eingespannt und die Kammer mit Transferpuffer befüllt bis das Gel und die Schwämme vollständig bedeckt waren. Der Transfer Blot wurde mit einer Spannung von 30 V eine Stunde lang durchgeführt.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Proteintransfer entnommen, zur Transferkontrolle 20 Sekunden lang mit Ponceau S angefärbt und danach unter fließendem Wasser gespült. Nachdem die Banden markiert wurden, wurde die Membran eine Stunde in 5 % Blockierungsmilch auf einem Taumler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Proteine zu blockieren und so das Hintergrundrauschen zu vermindern.

Nach kurzem Spülen mit TBS-Tween wurde die Membran mit den Primärantikörpern (gegen TNF- α , IL-1 β , IL-6, β -Actin) jeweils 1:400 in 2,5 % Milchpulver luftblasenfrei in Folie verschweißt und zwölf Stunden lang bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Danach erfolgten drei Waschzyklen mit TBS-Tween von jeweils zehn Minuten und die Inkubation mit dem zweiten Antikörper in einer Verdünnung von 1:2.000 in 2,5 % Milchpulver für zwei Stunden, eben-

falls auf dem Taumler. Drei weitere Waschzyklen mit TBS-Tween von jeweils zehn Minuten entfernten die nicht oder nur lose gebundenen Antikörper. Nach Ansetzen der Detektionslösung aus Detection solution 1 und 2 zu gleichen Teilen wurde die Membran eine Minute lang damit bedeckt und anschließend mit einem sauberen Papierhandtuch trockengetupft. Im Anschluss wurde die Membran in der Dunkelkammer auf einen Film aufgebracht und dieser je nach Belichtungsergebnis ca. zwei bis zehn Minuten lang belichtet und danach entwickelt.

Die so auf dem Film entstandenen Banden wurden mit einem Scanner bei höchster Auflösung und Schärfe eingescannt. Die Auswertung erfolgte durch die Beobachtung der relativen Schwärzung des Films in Bezug auf die unbestrahlten Kontrollen und β -Actin.

2.2.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.2.7.1 Prinzip der Detektion von Proteinen mittels ELISA

Am Boden der Reaktionskammern einer Mikroplatte sind monoklonale Antikörper gegen das zu untersuchende Protein fixiert. Nach Zugabe der entsprechenden Probe bindet das darin enthaltene, gesuchte Protein an den am Kammerboden fixierten, spezifischen Antikörper. Im nächsten Schritt wird ein zweiter, polyklonaler Antikörper, der mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, zugegeben und bindet im Sandwichprinzip an das nun immobilisierte Protein. Nicht gebundene Proteine der Probe und Antikörper werden nach jedem Schritt durch mehrmaliges Waschen vollständig entfernt. Im letzten Schritt führt die Zugabe der Substrat-Lösung (Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin) zu einer Farbreaktion, deren Intensität proportional zur Menge des gebundenen Proteins ist. Durch Zugabe von Salzsäure als Stopp-Lösung wird anschließend diese Farbreaktion in allen Kammern gleichzeitig beendet. Zur quantitativen Auswertung wird die Intensität der Färbung absorptionsphotometrisch bestimmt. Die einzelnen Proteinkonzentrationen werden anhand einer Extinktions-Konzentrations-Standardkurve errechnet. Diese erhält man aus den Absorptionswerten einer im selben Versuch ebenfalls gemessenen Kalibrierungs-Lösung mit bekannter Proteinkonzentration, die als Verdünnungsreihe eingebracht und gemessen wird. Eine zusätzliche Kontrollprobe bekannter Konzentration sichert die Validität jeder Messreihe.

Zur Analyse der entsprechenden Zytokin-Konzentrationen in Serum und Lebergesamtprotein wurden die Quantikine Rat Immunoassay Kits TNF- α , IL-1 β und IL-6 von R&D-Systems verwendet. Die Kits wurden ausschließlich mit den mitgelieferten Reagenzien und streng nach den zugehörigen Protokollen von R&D-Systems verwendet.

2.2.7.2 Vorbereiten der Proben

Die Untersuchung der Serumproben erforderte bei IL-6- und TNF- α -Kits eine 1:2-Verdünnung des Serums mit Calibrator-Diluent RD5-16 (IL-6) bzw. RD5-17 (TNF- α), bei IL-1 β war eine 1:3-Verdünnung mit Calibrator-Diluent RD5Y empfohlen. Zur Untersuchung der Proteinlösungen aus dem Lebergewebe wurde die Verdünnung der Proben jeweils so vorgenommen, dass die absorptionsphotometrischen Messergebnisse im Bereich der Proteinkonzentrationen der jeweiligen Standardreihe lagen, um den Messbereich nicht zu verlassen. Die tatsächliche Konzentration des jeweiligen Zytokins wurde nach Abschluss der Messung aus den jeweiligen Rohdaten durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor errechnet.

2.2.7.3 Vorbereiten der Reagenzien

Zur Durchführung des ELISA wurden die mitgelieferten Reagenzien streng nach Vorgabe des Herstellers vorbereitet und verwendet.

Zur Herstellung des Waschpuffers wurden Waschpuffer-Konzentrat und destilliertes Wasser im angegebenen Verhältnis gemischt. Um die Konjugat-Lösung vorzubereiten, wurde die konzentrierte Lösung des polyklonalen Antikörperkonjugats mit Horseradish-Peroxidase (Konjugat-Konzentrat) wie angegeben verdünnt (Konjugat-Diluent). Maximal 15 Minuten vor Gebrauch wurde die Substrat-Lösung aus gleichen Teilen Wasserstoffperoxid (Color-Reagent A) und Tetramethylbenzidin (Color-Reagent B) hergestellt. Der Rat-TNF- α -/ IL-1 β -/IL-6-Standard wurde mit 2 ml Calibrator-Diluent rekonstituiert. Daraus wurden folgende Verdünnungsreihen hergestellt:

TNF- α	[800/400/200/100/50/25/12,5/0 pg/ml]
IL-1 β	[1.000/500/250/125/62,5/31,2/15,6/0 pg/ml]
IL-6	[4.000/2.000/1.000/500/250/125/62,5/0 pg/ml]

2.2.7.4 Durchführung des ELISA

Nach Vorlegen von 50 μ l Assay-Diluent wurden jeweils 50 μ l der Proben, der Standardverdünnungsreihe und der Kontrolle in je eine Kammer der 96-Loch-Mikroplatte pipettiert, die Platte mit dem mitgelieferten, selbstklebenden Film dicht verschlossen und zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde jede Kammer fünfmal mit jeweils 400 μ l Waschpuffer gewaschen und dann 100 μ l des jeweiligen Konjugats in jede Kammer pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation von zwei Stunden mit anschließendem erneutem Waschzyklus. Zur Farbentwicklung wurden danach 100 μ l Substrat-Lösung pro Kammer zugegeben und

die Platte nochmals 30 Minuten lang lichtgeschützt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach Ablauf der 30 Minuten mit 100 µl HCl (Stopp-Lösung) beendet und die Absorption von Licht der vorgegebenen Wellenlängen 450 nm und 540 nm gemessen. Mithilfe von Kammern, die ohne Proben mitgelaufen waren, konnte eine Leerwertkorrektur durchgeführt werden.

2.2.8 Statistische Auswertung und Bearbeitung der gewonnenen Daten

Die gewonnenen Daten wurden mithilfe von Microsoft Excel 2003 (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) und KaleidaGraph (Synergy Software, Reading PA, USA) ausgewertet und archiviert. Zur Untersuchung statistisch bedeutsamer Mittelwertsunterschiede (Vergleich der Parameternittelwerte in der Versuchsgruppe mit den entsprechenden Mittelwerten der unbestrahlten Kontrollgruppe) wurde der T-Test verwendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ (zweiseitiger Test) angenommen.

Weiterhin wurde zum Erstellen von Texten, Protokollen und Tabellen Microsoft Word 2003 (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Real-Time PCR

3.1.1 Strahleninduzierte Veränderungen der Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6

Zur Detektion der Veränderung der Genexpression wurde RNA der bestrahlten Lebern und der unbestrahlten Kontrollen isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend eine Real-Time PCR durchgeführt.

Die Ergebnisse der Real-Time PCR-Untersuchungen wurden auf die Expression von Ubiquitin als Housekeeping-Gen bezogen. Um die relative Veränderung zu den nicht bestrahlten Kontrollen zu verdeutlichen, wurde für diese der Wert als 1 gesetzt und die Messwerte als Produkt von 1 dargestellt.

TNF- α

Für TNF- α zeigte sich bei der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Versuchsreihe zu allen Zeitpunkten eine Hochregulation, dabei statistisch signifikant drei (Faktor 4,10) sowie zwölf Stunden (Faktor 5,25) nach der Bestrahlung (s. Tabelle 1; Abb. 2).

Tabelle 1: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von TNF-alpha auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen (=1); MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n= 5 pro Zeitpunkt

	MW	SD	p-Wert t-Test
Nach 1 h	4,73	4,17	0,053
Nach 3 h	4,10	2,22	0,007
Nach 6 h	6,61	6,36	0,056
Nach 12 h	5,25	4,37	0,039
Nach 24 h	1,49	0,99	0,251
Nach 48 h	2,83	2,55	0,110

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n= 5 pro Zeitpunkt

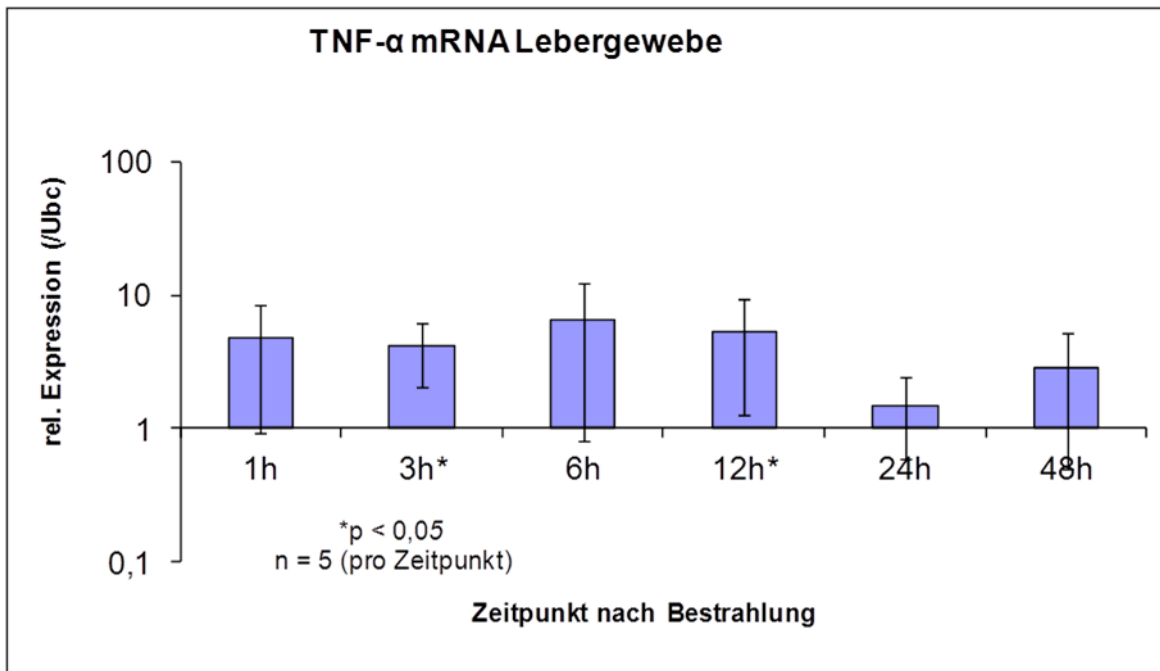


Abbildung 1: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von TNF-alpha auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen (=1); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen, n = 5 pro Zeitpunkt

IL-1 β

Für IL-1 β zeigte sich bei der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Versuchsreihe zu allen Zeitpunkten eine Hochregulation, dabei statistisch signifikant sechs Stunden (Faktor 4,95) nach der Bestrahlung (s. Tabelle 2; Abb. 3).

Tabelle 2: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von IL-1 β auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen (=1); MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n= 5 pro Zeitpunkt

	MW	SD	p-Wert t-Test
Nach 1 h	14,34	14,91	0,054
Nach 3 h	5,91	6,32	0,086
Nach 6 h	4,95	3,51	0,020
Nach 12 h	7,33	10,78	0,181
Nach 24 h	4,47	6,68	0,232
Nach 48 h	2,68	2,98	0,196

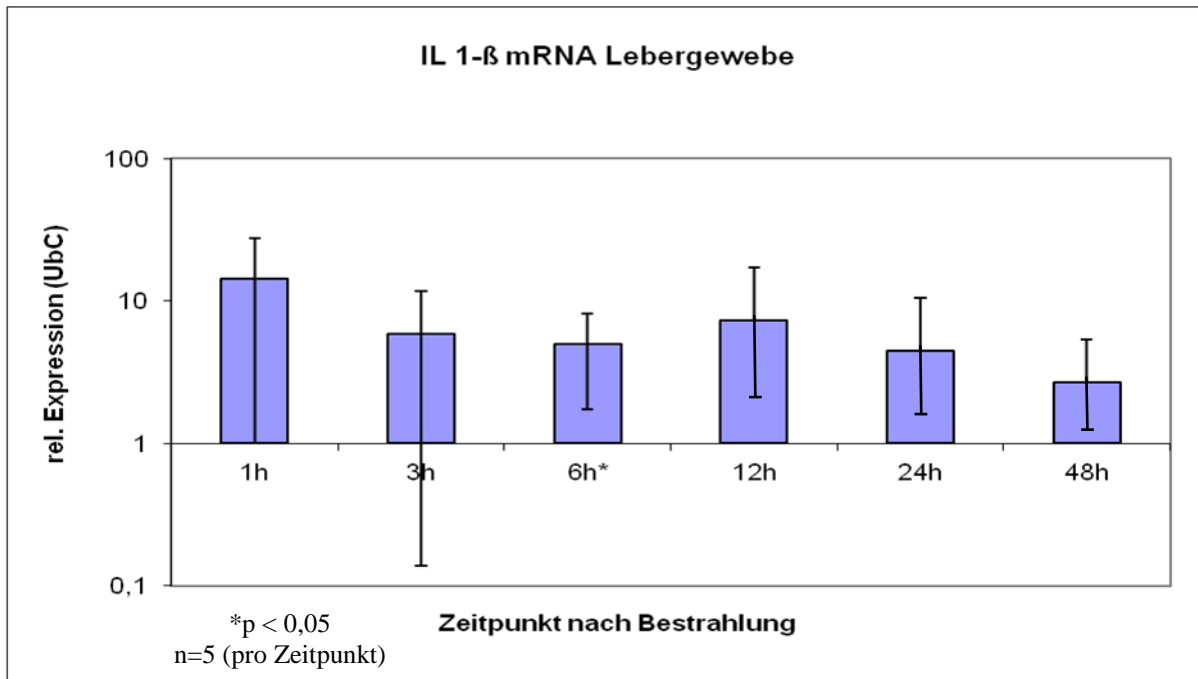


Abbildung 2: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von IL-1 β auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen (=1); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen, n = 5 pro Zeitpunkt

IL-6

Für IL-6 zeigte sich bei der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Versuchsreihe zu allen Zeitpunkten eine Hochregulation, dabei statistisch signifikant drei (Faktor 17,80), sechs (Faktor 26,23) sowie 48 Stunden (Faktor 4,70) nach der Bestrahlung (s. Tabelle 3; Abb. 4).

Tabelle 3: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von IL-6 auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen (=1); MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 5 pro Zeitpunkt

	MW	SD	p-Wert t-Test
Nach 1 h	9,92	17,39	0,238
Nach 3 h	17,80	13,61	0,013
Nach 6 h	26,23	22,98	0,023
Nach 12 h	16,60	22,08	0,114
Nach 24 h	3,11	3,75	0,198
Nach 48 h	4,70	3,94	0,044

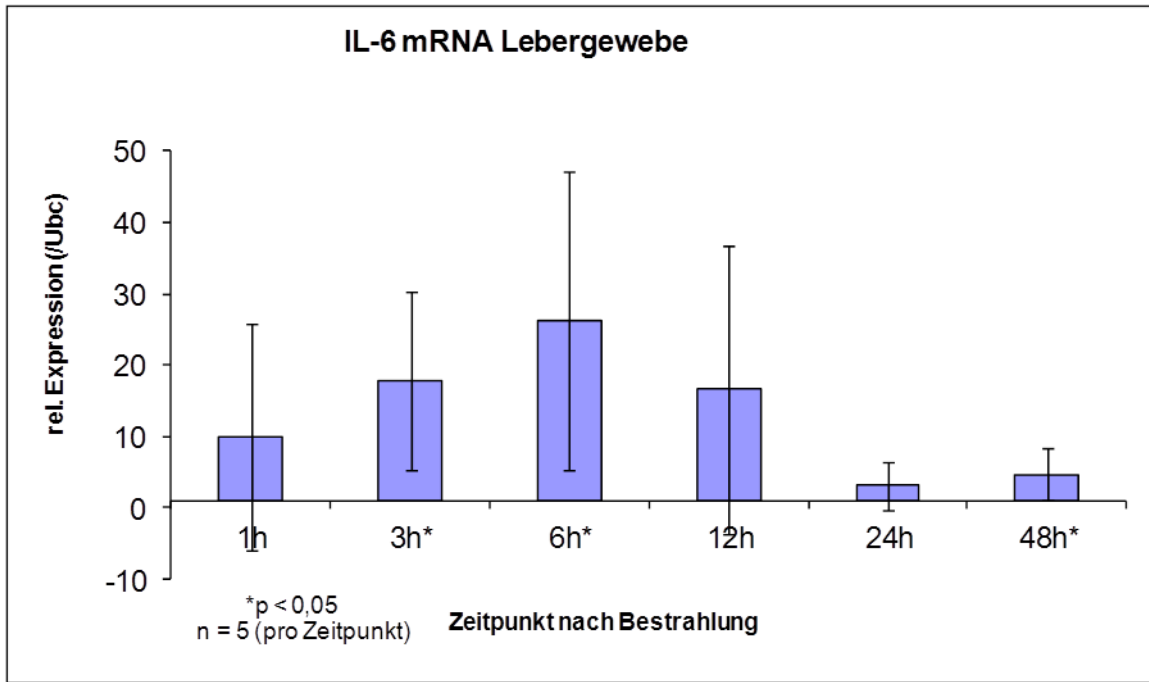


Abbildung 3: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von IL-6 auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen (=1); die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen, n = 5 pro Zeitpunkt

3.2 Western Blot

3.2.1 Nachweis von TNF- α , IL-1 β und IL-6 im Lebergewebe nach Bestrahlung auf Proteinebene mittels Western Blot

Zur Darstellung der Konzentration der gesuchten Zytokine auf Proteinebene wurden Western Blot-Untersuchungen durchgeführt. Als Referenz diente die Darstellung von β -Actin.

TNF- α

Abbildung 5 zeigt beispielhaft die Konzentrationen von TNF- α zu verschiedenen Zeitpunkten nach selektiver Leberbestrahlung auf Proteinebene im Western Blot (man erkennt eine vermehrte Konzentration sowohl im Verlauf als auch im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle).

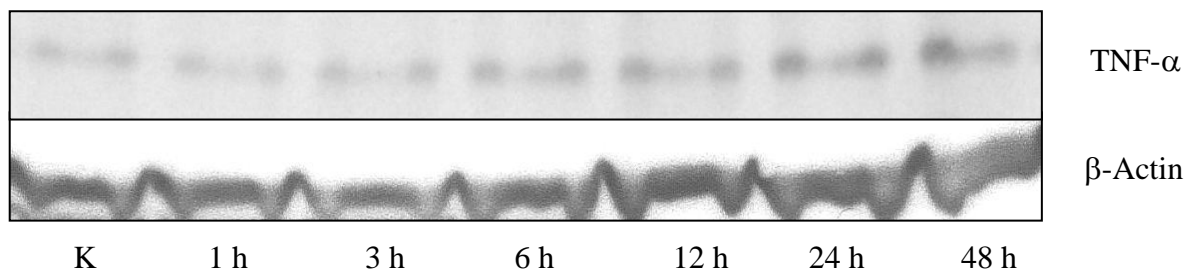


Abbildung 4: Repräsentative Darstellung eines von insgesamt 3 Western Blots der Konzentrationen von TNF- α zu verschiedenen Zeitpunkten nach selektiver Leberbestrahlung auf Proteinebene im Western Blot, auch im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle

IL-1 β

Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Konzentrationen von IL-1 β zu verschiedenen Zeitpunkten nach selektiver Leberbestrahlung auf Proteinebene im Western Blot (man erkennt eine vermehrte Konzentration sowohl im Verlauf als auch im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle).

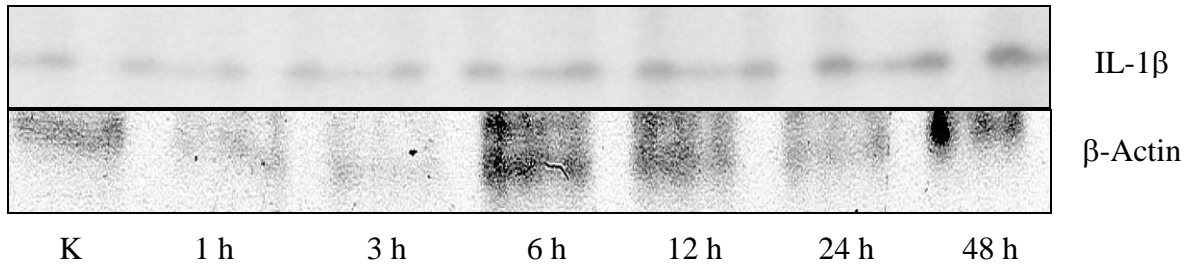


Abbildung 5: Repräsentative Darstellung eines von insgesamt 3 Western Blots der Konzentrationen von IL-1 β zu verschiedenen Zeitpunkten nach selektiver Leberbestrahlung auf Proteinebene im Western Blot, auch im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle

IL-6

Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Konzentrationen von IL-6 zu verschiedenen Zeitpunkten nach selektiver Leberbestrahlung auf Proteinebene im Western Blot (man erkennt eine vermehrte Konzentration sowohl im Verlauf als auch im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle).

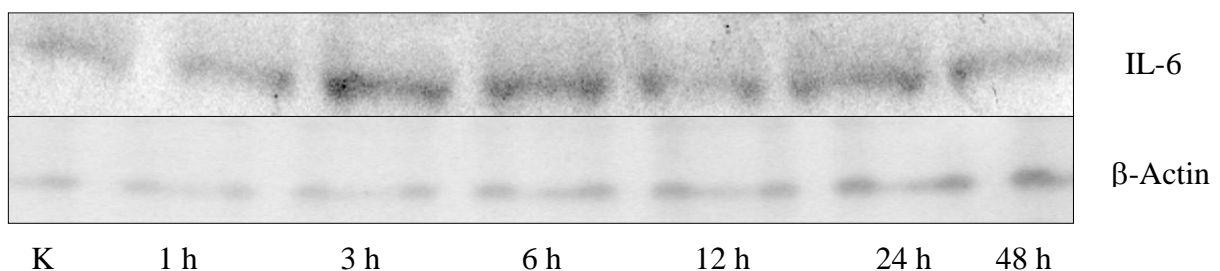


Abbildung 6: Repräsentative Darstellung eines von insgesamt 3 Western Blots der Konzentrationen von IL-6 zu verschiedenen Zeitpunkten nach selektiver Leberbestrahlung auf Proteinebene im Western Blot, auch im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle

3.3 ELISA

3.3.1 Strahleninduzierte Veränderungen der Proteinkonzentrationen der Zytokine im Serum der bestrahlten Ratten im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen

Die Sera der Versuchstiere wurden eine, drei, sechs, zwölf, 24 und 48 Stunden nach Bestrahlung der Leber entnommen und mittels ELISA die Konzentrationen von TNF- α , IL-1 β und IL-6 bestimmt. Die Messung wurde für das Serum jedes Tieres dieser Versuchsreihe einzeln vorgenommen, es fand kein Pooling der Sera statt.

TNF- α

Es zeigt sich eine Erhöhung der Serumkonzentrationen im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung und im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, dabei statistisch signifikant zum Zeitpunkt eine Stunde nach Bestrahlung (s. Tabelle 4 und Abb. 8).

Tabelle 4: Serumkonzentrationen von TNF-alpha zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 5 pro Zeitpunkt

	MW (pg/ml)	SD	p-Wert t-Test
Kontrolle	0,34	0,67	
Nach 1 h	5,26	3,56	0,002
Nach 3 h	11,30	17,15	0,092
Nach 6 h	1,01	1,93	0,366
Nach 12 h	0,19	0,39	0,594
Nach 24 h	0,25	0,53	0,777
Nach 48 h	0,61	1,19	0,578

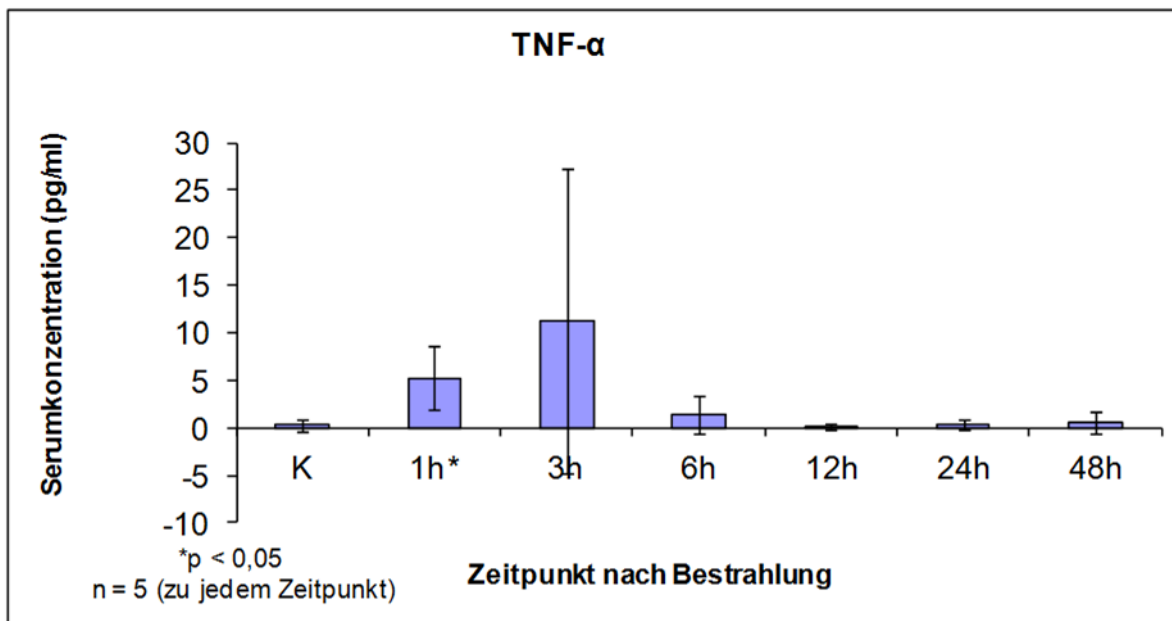


Abbildung 7: Serumkonzentrationen von TNF-alpha zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen; Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen, n = 5 pro Zeitpunkt

IL-1 β

Es zeigt sich eine Erhöhung der Serumkonzentrationen drei, zwölf und 48 Stunden nach Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, dabei allerdings statistisch signifikant zu keinem Zeitpunkt nach Bestrahlung (s. Tabelle 5 und Abb. 9).

Tabelle 5: Serumkonzentrationen von IL-1 β zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 5 pro Zeitpunkt

	MW (pg/ml)	SD	p-Wert t-Test
Kontrolle	50,66	49,80	
Nach 1 h	41,38	39,18	0,727
Nach 3 h	82,21	45,39	0,340
Nach 6 h	33,92	23,14	0,553
Nach 12 h	53,63	37,93	0,910
Nach 24 h	32,80	5,19	0,503
Nach 48 h	67,12	55,01	0,599

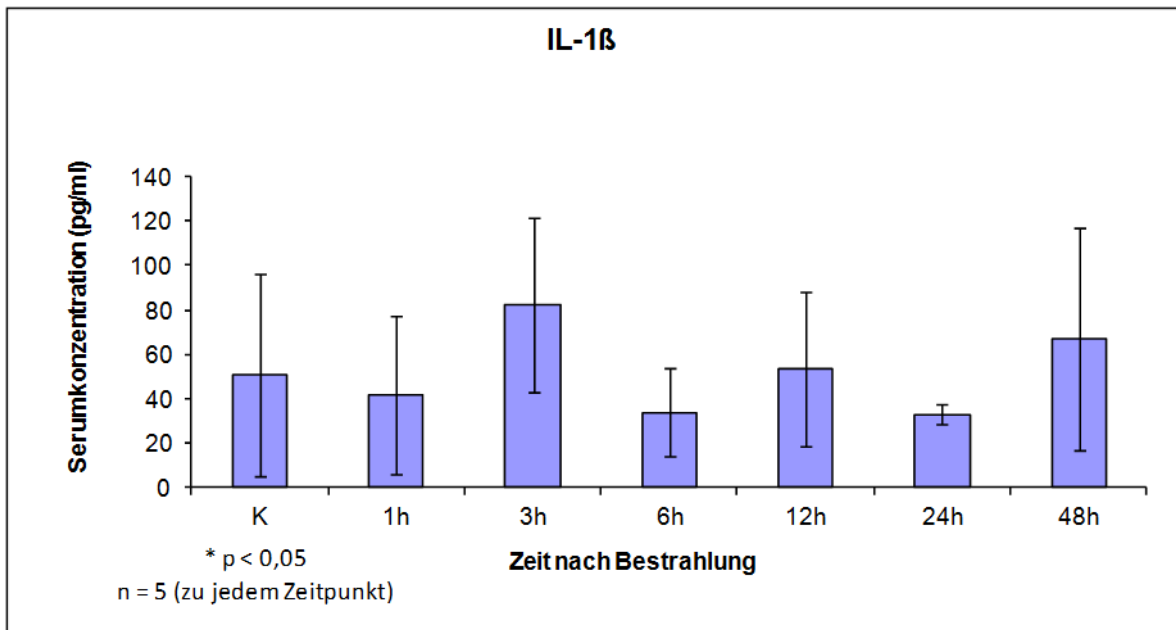


Abbildung 8: Serumkonzentrationen von IL-1 β zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen; Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen, n = 5 pro Zeitpunkt

IL-6

Es zeigt sich eine Erhöhung der Serumkonzentrationen im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung und im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle nach einer, sechs, zwölf, 24 und 48 Stunden, dabei allerdings statistisch signifikant zu keinem Zeitpunkt nach Bestrahlung (s. Tabelle 6 und Abb. 10).

Tabelle 6: Serumkonzentrationen von IL-6 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = 5 pro Zeitpunkt

	MW	SD	p-Wert t-Test
Kontrolle	10,55	17,91	
Nach 1 h	27,55	50,10	0,452
Nach 3 h	10,13	11,42	0,963
Nach 6 h	42,05	40,22	0,110
Nach 12 h	44,85	57,98	0,190
Nach 24 h	23,67	24,22	0,311
Nach 48 h	12,65	17,88	0,843

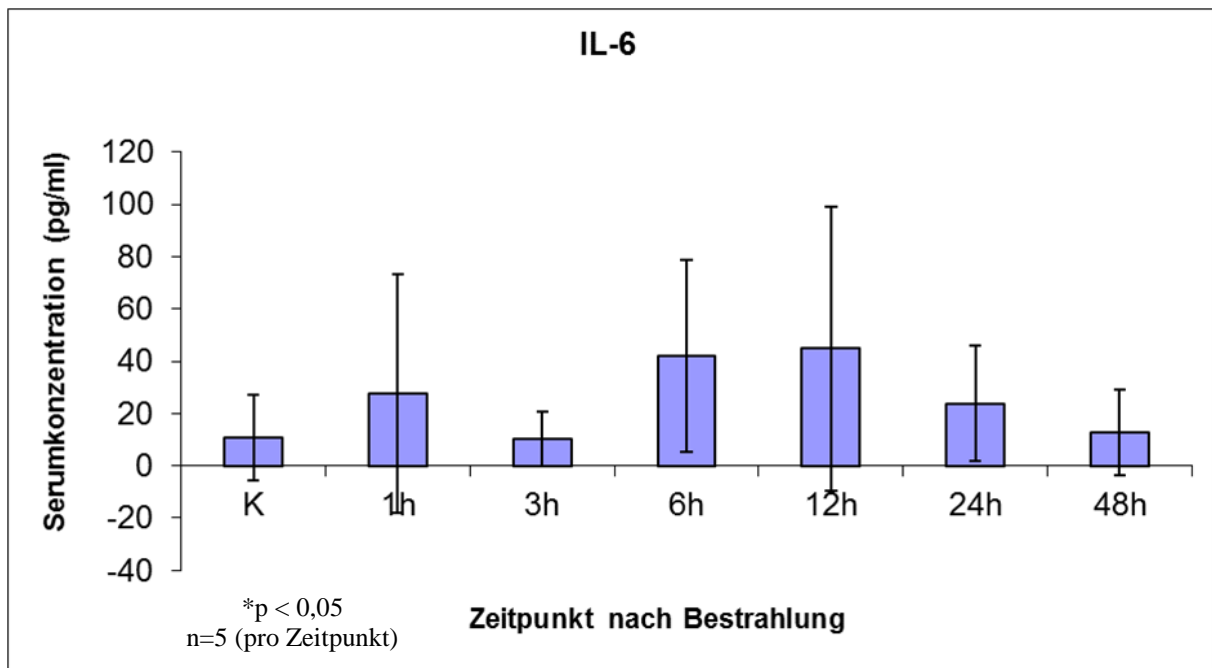


Abbildung 9: Serumkonzentrationen von IL-6 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen; Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen, n = 5 pro Zeitpunkt

4 Diskussion

4.1 Bedeutung der ausgewählten pro-inflammatorischen Zytokine bei der toxischen Gewebeschädigung durch Bestrahlung und andere Noxen

4.1.1 Grundsätzliche Bedeutung der ausgewählten Zytokine

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zytokine - TNF- α , IL-6 und IL-1 β - wurden exemplarisch ausgewählt, da diese für die Aktivierung der Synthese von Akutphase-Proteinen in der Leber sowie für die Aktivierung und Chemotaxis von weiteren Entzündungszellen verantwortlich sind (Ramadori und Meyer zum Büschenfelde 1989). Als Reaktion auf ein schädigendes Agens (z. B. Virus, Verletzung, Strahlung) werden in der Leber Makrophagen wie die spezialisierten Kupffer-Zellen mit Sitz im sinusoiden Endothel aktiviert (You et al. 2013; Ramadori und Christ 1999). Diese exprimieren sowohl Rezeptoren für IL-1 β und TNF- α , als auch selbst Zytokine wie IL-6, IL-1 β und TNF- α , induzieren die Expression von Zell-Adhäsions-Molekülen in Endothelzellen und sind damit zentral an der Kommunikation der verschiedenen in der Leber vorkommenden Zellsysteme beteiligt (Ramadori und Christ 1999; Ramadori und Armbrust 2001; Zimmermann et al. 2012). Damit gelten IL-6, IL-1 β und TNF- α als wesentlich im Verlauf der Akuten Phase und sind verantwortlich für die Verschiebung des Gleichgewichts der Expression wichtiger Enzyme und Proteine (Cosgrove et al. 2008; Ramadori und Christ 1999). Nach derzeitigem Wissensstand kommt dabei insbesondere TNF- α , IL-6 und IL-1 β eine ambivalente Rolle zu: So haben die primär pro-inflammatorischen Zytokine neben dem Potenzial der Gewebeerstörung auch Anteil an der Regeneration des Lebergewebes, also der kompensierenden Proliferation der Hepatozyten (Yamada et al. 1997; Plümpe et al. 1999; Argast et al. 2004; Fausto et al. 2006; Cosgrove et al. 2008). Es wird ihnen u.a. auch eine Kontrollfunktion wichtiger Schutz- und Reparaturproteine wie z. B. der Komplementinhibitoren CD 46, 55, 59 zugeschrieben (Fausto et al. 2006; Halme et al. 2009; Galun und Rose-John 2013).

Der Transduktionsfaktor TNF- α kann von verschiedenen Zellen produziert werden, hauptsächlich wird er jedoch von aktivierten, phagozytotischen Monozyten und gewebständigen Makrophagen freigesetzt, wie z. B. den Lebermakrophagen (Ramadori und Armbrust 2001).

IL-1 β wird in der Leber ebenfalls von Lebermakrophagen sezerniert (Ramadori und Armbrust 2001). Die Auswirkungen dieses Interleukins sind bisher nicht völlig klar, die Wechselwir-

kung zwischen IL-1 β und TNF- α komplex: Einerseits wird IL-1 β als Gegenspieler zu TNF- α in der Form beschrieben, dass es TNF- α hemmt (Bohlinger et al. 1995; Cosgrove et al. 2008), es gibt aber auch Hinweise, dass IL-1 β die Expression von TNF- α in Hepatozyten induzieren kann (Yoshigai et al. 2014). Über diesen Weg der Verschiebung des metabolischen Gleichgewichts fungiert IL-1 β ebenfalls als Gegenspieler zu TNF- α , und zwar im Prozess der eigentlich durch TNF- α eingeleiteten Zellregeneration (Cosgrove et al. 2008). Takehara et al. (1999) und Lutz et al. (2014) fanden einen protektiven Effekt vor Apoptose *in vivo* (Takehara) oder durch die Inkubation von Hepatozyten (Lutz) mit IL-1 β .

IL-6 wird im Falle einer Entzündung in Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten über den Nf κ B-Weg durch Stimulation von TNF- α oder Interleukinen produziert (Ramadori und Christ 1999). Auch IL-6 hat multiple Funktionen. Es kann an weitere Transkriptionsfaktoren binden und zahlreiche Zielgene aktivieren. IL-6 aktiviert über die direkte Bindung via Rezeptor an Hepatozyten dort die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, so beispielsweise von Komplementfaktor I und Zytokinen und kann so als ein Gegenspieler zu TNF- α fungieren (Schlaf et al. 2001). Aus dieser zunächst bekannten Funktion resultierte die frühere Bezeichnung ‚Hepatozyten-stimulierender Faktor HSF‘. So korreliert die Schwere chronischer Lebererkrankungen mit der Höhe des IL-6-Spiegels (Ramadori und Armbrust 2001). IL-6 hat möglicherweise jedoch auch protektive Funktionen im Sinne der Verhinderung der Hepatozyten-Apoptose, und spielt damit eine Rolle in der Regenerationsfähigkeit des Lebergewebes (Yamada et al. 1997; Kuo et al. 2001; Streetz et al. 2003; Galun und Rose-John 2013). Aber auch diese Aktivität unterliegt weiteren Einflussparametern: So variiert das Potenzial von IL-6 zur Regeneration des Lebergewebes in Abhängigkeit des auslösenden schädigenden Agens (Fausto et al. 2006).

Diese Ausführungen zeigen, dass das Zusammenspiel der Zytokine mit regulatorischen Proteinen und Wachstumsfaktoren in der Leber komplex ist. So wirken Interleukin-1 und Interleukin-6 neben anderen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen als Mediatoren bei der Akute-Phase-Reaktion in der Leber (Ramadori und Christ 1999; Argast et al. 2004; Fausto et al. 2006; Cosgrove et al. 2008). Andere Zytokine und Chemokine, insbesondere TGF und HGF, modulieren die Expression teils als Antagonisten, teils in Synergie (Ramadori und Christ. 1999). Die zellulären Prozesse in der Akuten Phase werden letztlich durch die Art der Schädigung, die Level der übrigen Zytokine und Enzyme sowie die Spezies selbst bestimmt (Fausto et al. 2006).

4.1.2 Strahleninduzierte Expression von TNF- α , IL-6 und IL-1 β nach selektiver Leberbestrahlung im verwendeten Tiermodell und die Rolle strahleninduzierter Zytokinexpressionen bei der strahleninduzierten Leberschädigung / anderen strahleninduzierten Organschädigungen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Experimenten zeigte sich sowohl die Gen- als auch die Proteinexpression der untersuchten Zytokine innerhalb der ersten 48 Stunden nach selektiver Leberbestrahlung zum Teil statistisch signifikant im Lebergewebe hochreguliert. Es wurde darüber hinaus auch ein Anstieg der Serumkonzentrationen der Zytokine nachgewiesen. Bei der Bewertung der vorliegenden Daten ist die Bestrahlung als nicht-invasive, CT-geplante selektive, perkutane Leberbestrahlung von besonderer Bedeutung: Durch die möglichst selektive Bestrahlung des Organs können Einflüsse der Bestrahlung auf andere Organe und damit auch eine sekundäre Beeinflussung der Zytokinexpression weitestgehend ausgeschlossen werden. Dies unterscheidet die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuchsanordnung erheblich von den Arbeiten anderer Arbeitsgruppen, bei denen entweder eine Ganzkörperbestrahlung durchgeführt wurde (Geraci et al. 1985a) oder eine invasive Versuchsanordnung gewählt wurde, bei der nach einer Laparatomie intraoperativ eine Strahlentherapie unter mechanischer Abschirmung der übrigen Abdominalorgane durchgeführt wurde (Geraci et al. 1985b; Geraci et al. 1991; Geraci und Mariano 1993; Geraci und Mariano 1996) – bei einem solchen Vorgehen ist eine sekundäre Beeinflussung der Zytokinexpression durch die durch den invasiven Eingriff entstehende Entzündungsreaktion nicht ausgeschlossen und hochwahrscheinlich. Die Ergebnisse bestätigen die aufgestellte Hypothese, dass eine strahleninduzierte Zytokinexpression in der Frühphase an der Pathogenese der strahleninduzierten Leberschädigung beteiligt ist. Vorgehende *in vitro*-Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten dabei gezeigt, dass die Bestrahlung isolierter Hepatozyten mit 2, 8 und 25 Gy keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Zellen hatte. In einer weiteren Versuchsanordnung wurde das Kulturmedium der Hepatozyten zur Hälfte mit dem Überstand bestrahlter Lebermakrophagen ersetzt und die Hepatozyten dann bestrahlt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate der Hepatozyten im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen und zu den bestrahlten Zellen ohne den Überstand der Lebermakrophagen. Der Anstieg der Apoptoserate war dabei signifikant erhöht durch Überstände 6 und 12 Stunden nach Bestrahlung. 24 Stunden nach Bestrahlung der Lebermakrophagen konnte durch Zugabe des Überstandes keine erhöhte Apoptoserate mehr induziert werden. Dieser Effekt konnte durch Zuga-

be von Anti-TNF- α Antikörpern deutlich verringert werden (Christiansen et al. 2004). Im Überstand der bestrahlten Lebermakrophagen konnte - im Gegensatz zu dem der bestrahlten Hepatozyten - eine erhöhte Konzentration von TNF- α nachgewiesen werden. Auch durch direkte Zugabe von TNF- α zu den Hepatozyten konnte - in etwas geringerem Ausmaß - eine gesteigerte Apoptoserate induziert werden, die Zugabe von anti-TNF- α Antikörpern hob den Effekt nahezu vollständig auf (Christiansen et al. 2004). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass bei der Pathogenese der RILD eine zytokinvermittelte Entzündungsreaktion einen wesentlichen Anteil hat und dass TNF- α dabei eine Schlüsselfunktion zukommt (Christiansen et al. 2004).

Auch bei anderen strahleninduzierten Organschädigungen konnte eine Beteiligung solcher Zytokin-vermittelter Zell-Zell-Interaktionen experimentell beschrieben werden, so zum Beispiel bei der strahleninduzierten Reaktion der Lunge, des Darmes oder des Gehirns (Rübe et al. 2004; Rübe et al. 2005; Ong et al. 2010; Liu et al. 2015; Lee et al. 2010).

Die Arbeitsgruppe Rübe et al. veröffentlichte dazu 2005 Daten von *in vivo*-Untersuchungen, für die der Thorax von Mäusen mit einer Dosis von 12 Gy in einer Einzelfraktion bestrahlt wurden. Die übrigen Körperpartien wurden mit Bleistreifen abgeschirmt. Jeweils drei bestrahlte Tiere und ein nichtbestrahltes Tier wurden zu verschiedenen Zeitpunkten von 30 Minuten bis 24 Wochen nach der Bestrahlung getötet und das Lungengewebe für Real-Time PCR und histologische Untersuchungen asserviert. Die Genexpression und die Gewebekonzentrationen der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 α wurden im Zeitverlauf untersucht. Die Genexpression für TNF- α stieg dabei bei den bestrahlten Tieren bereits nach einer Stunde an und blieb bis 12 Stunden nach der Bestrahlung signifikant erhöht. Danach fiel sie wieder auf das Niveau der unbestrahlten Tiere ab, um zu den Zeitpunkten zwei bis 24 Wochen erneut anzusteigen. Auch in den immunhistochemischen Untersuchungen ergab sich eine signifikant gesteigerte Reaktion für TNF- α zu allen Zeitpunkten ab eine Stunde nach der Bestrahlung, die in ihrem zeitlichen Verlauf dem der Genexpression entsprach. Die Genexpression für IL-6 stieg sechs Stunden nach der Bestrahlung signifikant an, um dann ebenfalls wieder auf das Ausgangsniveau abzufallen. Auch für IL-6 ergab sich erneut ein späterer Anstieg, der nach vier und acht Wochen signifikant war. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten einen vergleichbaren zeitlichen Verlauf nach, mit signifikanten Anstiegen nach zwölf und 24 Stunden sowie nach vier, sechs, acht und 16 Wochen. IL-1 α wurde auf der genetischen Ebene ebenfalls nach 6 Stunden sowie nach acht und 16 Wochen signifikant hochreguliert. Zu den anderen Zeitpunkten kehrte die Genexpression etwa auf das Level der unbestrahlten Kon-

trollen zurück. Wiederum bestätigten die Gewebeuntersuchungen diesen Verlauf mit einer leichten zeitlichen Verzögerung und signifikanten Anstiegen nach sechs, zwölf und 24 Stunden, sowie nach vier und acht Wochen (Rübe et al. 2005). Diese Ergebnisse zeigen auf, dass das Lungengewebe nicht nur das Ziel einer strahleninduzierten Entzündungsreaktion ist, sondern diese auch durch die ortsständige Synthese und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine anstößt und unterhält (Rübe et al. 2005). Die Ergebnisse sind mit dem Verlauf der Zytokinregulation in den Versuchen zu dieser Arbeit vergleichbar.

Die Gruppe von Ong et al. (2010) bestrahlte das Abdomen von Ratten mit wöchentlich 3 Fraktionen von 2,5 Gy. Alle übrigen Körperpartien wurden mit Bleistreifen abgeschirmt. Jede Woche wurden 5 Tiere getötet und der gesamte Darm für die Untersuchungen asserviert. So wurden Gesamtdosen von 7,5 bis 45 Gy appliziert. Das Darmgewebe wurde entnommen und die Veränderungen der Genexpression von TNF- α , IL-6 und IL-1 β mittels Real-Time PCR, sowie auf Proteinebene durch immunhistochemische Färbungen untersucht. Dabei zeigten sich die Genexpression für IL-6 und IL-1 β nach Dosisapplikation von 30 Gy, 37,5 Gy und 45 Gy erhöht.

Liu et al. bestrahlten das Abdomen von Ratten mit einer Einzeldosis von 9 Gy und einem Bestrahlungsfeld von 8,5 x 8,5 cm. Die Serumkonzentration von IL-2 und IL-6 wurde im Serum der Tiere vier Tage nach der Bestrahlung mittels Immunassay gemessen. Es zeigten sich signifikant höhere Werte als bei den unbestrahlten Kontrollen (Liu et al. 2015) wobei durch das Studiendesign keine Beobachtung der Konzentration über die Zeit möglich war.

Die Auswirkung von Bestrahlung auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine im Gehirn untersuchten Lee et al. in einem weiteren Rattenmodell. Hier wurde eine Ganzhirnbestrahlung bei Ratten mit einer Dosis von 10 Gy durchgeführt (Lee et al. 2010). Vier, acht und 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Tiere getötet und mittels Real-Time PCR, ELISA und Immunhistochemie die Genexpression und die Konzentrationen von unter anderem TNF- α , IL-6 und IL- β im Gewebe untersucht. Dabei zeigte TNF- α einen deutlichen und signifikanten Anstieg vier Stunden nach der Bestrahlung auf Gen- und Proteinebene. Acht und 24 Stunden nach Bestrahlung waren die Werte weiterhin signifikant erhöht im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen, fielen aber bereits wieder deutlich ab. Die Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten diese Ergebnisse und den zeitlichen Verlauf zusätzlich (Lee et al. 2010). Auch die Genexpression von IL-6 stieg bei den bestrahlten Tieren nach vier Stunden signifikant an um im Verlauf wieder abzufallen. Diese Veränderungen konnten allerdings auf Proteinebene nicht nachvollzogen werden (Lee et al. 2010). IL-1 β wurde auf genetischer Ebene

vier und acht Stunden signifikant mehrexprimiert und zeigte dann einen Abfall nach 24 h. Die Proteinkonzentration von IL-1 β war zu allen Zeitpunkten mit ansteigender Tendenz im zeitlichen Verlauf signifikant erhöht (Lee et al. 2010).

4.1.3 Die Rolle der Zytokine bei anderen toxischen Leberschäden

Die Beteiligung von Zell-Zell-Interaktionen durch Zytokine ist auch wesentlich bei der Pathogenese anderer toxischer Leberschädigungen, wie z. B. durch Kohlenstofftetrachlorid (CCL₄), D-Galactosamin und Acetaminophen - Paracetamol (Tuñón et al. 2009).

Die systemische Applikation von Kohlenstofftetrachlorid stellt dabei eine etablierte Methode dar, um zytotoxische Schäden der Leber zu untersuchen (Tuñón et al. 2009), da die Substanz eine zentrilobuläre Nekrose des Lebergewebes mit nachfolgendem fibrotischem Umbau verursacht (Weber et al. 2003). Folgende pathophysiologische Vorgänge liegen der Leberschädigung mit CCL₄ zugrunde: Zum einen wird Kohlenstofftetrachlorid in hochreaktive Trichlormethyl-Radikale metabolisiert, welche anschließend über die Peroxidation von Membranlipoiden zur zellulären Schädigung der Hepatozyten führen (Koch et al. 1974; Recknagel et al. 1989). Zum anderen werden entzündungsvermittelnde Substanzen aus aktivierten Lebermakrophagen freigesetzt, welche die primäre CCL₄-vermittelte Zellschädigung weiter vorantreiben (Badger et al. 1996). Hierbei spielt das Zytokin TNF- α , welches durch Makrophagen produziert und freigesetzt wird, eine entscheidende Rolle als Vermittler der Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle durch Endothelzellen und die dadurch ausgelöste Entzündungsreaktion mit Einwanderung weiterer Phagozyten in die geschädigten Areale (Wertheimer et al. 1992). Bei entsprechenden Studien an Knock-out-Mäusen, welchen der TNF-Rezeptor fehlte bzw. deren Gen für die Produktion von TNF- α deaktiviert war, blieben die fibrotischen Veränderungen und die großflächige Apoptose der Hepatozyten unter CCL₄-Exposition aus. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass dem Zytokin TNF- α im Hinblick auf die Langzeitschädigung der Leber eine Schlüsselrolle zukommt.

D-Galactosamin-Applikation dient ebenfalls zur Untersuchung toxischer Leberschäden *in vivo* (Tuñón et al. 2009) und führt zu einer polymorphen und disseminierten Nekrose von Hepatozyten, die mit einer deutlichen Vermehrung von Entzündungszellen wie Lebermakrophagen, Lymphozyten, segmentkernigen Granulozyten und Plasmazellen einhergeht (Keppler et al. 1968). Dieser Entzündungsprozess wird wesentlich durch die Freisetzung von TNF- α ausgelöst, welches vornehmlich in den Lebermakrophagen produziert und von ihnen freige-

setzt wird (Bradham et al. 1998). TNF- α vermittelt auch hier die Produktion und Ausschüttung weiterer Cytokine und Adhäsionsmoleküle wie Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) und Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), die die Einwanderung weiterer Entzündungszellen in das Leberparenchym ermöglichen und zu Apoptose und nachfolgender Nekrose der Hepatozyten führen (Bradham et al. 1998). Der toxische Effekt von D-Galactosamin konnte im Tierversuch durch Gabe eines TNF- α -Antikörpers signifikant reduziert werden (Yang et al. 2014), was die Bedeutung der zytokinvermittelten Entzündungsreaktion als Pathomechanismus ebenfalls unterstreicht.

Acetaminophen (Paracetamol) verursacht beim Menschen und im Tierversuch in hoher Dosierung schwere toxische Leberschäden mit gut erforschem und auf den Menschen übertragbarem Pathomechanismus (Tuñón et al. 2009; Mossanen und Tacke 2015). Der Hauptanteil von Acetaminophen wird durch Glucuronidierung und Sulfatierung metabolisiert und renal ausgeschieden. Etwa 10-20% werden in den Hepatozyten in N-acetyl-p-benzochinonimin umgewandelt (Mossanen und Tacke 2015). N-acetyl-p-benzochinonimin wird dann durch Glutathion in seine nicht-toxische Form reduziert. Wird die Reduktionskapazität überschritten, vermittelt das verbleibende N-acetyl-p-benzochinonimin eine Entzündungsreaktion, die vornehmlich durch Lebermakrophagen vermittelt wird (Kubes und Mehal 2012). Über TNF- α aus den Lebermakrophagen werden weitere Zytokine wie IL-1 β und IL-6 aktiviert und mittels ICAM-1 und VCAM-1 wandern nicht-gewebeständige Entzündungszellen ein (Kubes und Mehal 2012; Mossanen und Tacke 2015).

4.2 Bedeutung der Ergebnisse dieser Arbeit für die Klinik

Insbesondere im Rahmen interdisziplinärer Therapiekonzepte gewinnt die Strahlentherapie maligner Lebertumoren, z. B. beim Hepatozellulären Karzinom (Tanguturi et al. 2014; Hass und Mohnike 2014), bei Lebermetastasen (Aitken und Hawkins 2015) sowie anderer maligner Oberbauchtumoren wie z. B. beim Magenkarzinom (Smalley et al. 2012) klinisch immer mehr an Bedeutung. Dazu tragen auch die aktuellen Weiterentwicklungen der modernen Methoden der Hochpräzisionsbestrahlung wie zum Beispiel der stereotaktisch geführten Strahlentherapie von primären und sekundären Lebertumoren (Tao und Yang 2012; Rusthoven et al. 2009) oder auch brachytherapeutische Verfahren (Colletini et al. 2014) entscheidend bei. Noch immer aber ist die strahleninduzierte Leberschädigung in diesem Zusammenhang eine gefürchtete Toxizität und häufig Dosis-limitierend. In diesem Zusammenhang sind zukünftig detaillier-

te Kenntnisse der zugrunde liegenden Pathomechanismen von erheblicher Bedeutung. Auf der Grundlage solcher Kenntnisse könnten ggf. zukünftig Schutzmechanismen für das gesunde Gewebe entwickelt, die Schädigung verringert und die Regenerationsfähigkeit der Leber nach Bestrahlung verbessert werden, wodurch evtl. höhere Dosen im Rahmen einer Strahlentherapie sicher appliziert werden können.

Da nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe offensichtlich in der Frühphase der strahleninduzierten Leberschädigung Zell-Zell-Interaktionen über pro-inflammatorische Zytokine eine wesentliche Rolle spielen, könnte ein Ansatz darin bestehen, diese zu blockieren, z. B. durch monoklonale Antikörper. Solche Antikörper, z. B. gegen TNF- α (Adalimumab: Humira[®]; Golimumab: Simponi[®]; Infliximab: Remicade[®]), sind bereits etablierte und zugelassene Präparate bei der Therapie entzündlicher Darmerkrankungen (Sharma et al. 2015; Rutgeerts et al. 2015; Rutgeerts et al. 2005). Ebenso werden monoklonale Antikörper gegen Zytokinrezeptoren wie der Anti-IL-6-Rezeptorantikörper (Tocilizumab: RoActemra[®]) in der Behandlung entzündlicher Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, eingesetzt (Dougados et al. 2014).

Vor einem klinischen Einsatz sind aber sicherlich weitere experimentelle Untersuchungen notwendig. Zum einen muss geklärt werden, ob solche Antikörper tatsächlich die Entstehung der RILD verhindern oder zumindest abmildern können, zum anderen muss ausgeschlossen werden, dass solche Antikörper nicht auch einen Tumor-protectiven Effekt haben.

4.3 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass es auch in einem experimentellen Tiermodell *in vivo* nach selektiver Ganzleberbestrahlung sowohl auf RNA- wie auch Proteinebene zu einem signifikanten Anstieg der Expression ausgewählter Zytokine kommt. Zell-Zell-Interaktionen über Zytokine sind also möglicherweise in der Frühphase der strahleninduzierten Leberschädigung an der Pathogenese wesentlich beteiligt. Dies ist insofern von klinischer Bedeutung, als dass hierdurch Ansätze entstehen, durch therapeutische Maßnahmen die Entstehung der RILD im Rahmen strahlentherapeutischer Behandlungen zu beeinflussen und damit die therapeutische Breite bei der Bestrahlung maligner Leber – und Oberbauchtumoren zu erhöhen. Sicherlich handelt es sich aber um ein multifaktorielles Geschehen, an dem nicht nur die in dieser Arbeit gefundene Zytokinexpression beteiligt ist. Vor diesem Hintergrund waren und sind die Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit die Grundlage für weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe, nach denen auch eine Beteiligung strahleninduzierter Chemokin- sowie Adhäsionsmolekülexpression an den Pathomechanismen in der Frühphase der RILD postuliert werden kann. So konnten Moriconi et al. durch *in vivo*-Untersuchungen nachweisen, dass nach selektiver Bestrahlung der Leber bei Ratten (25 Gy) innerhalb von 48 Stunden eine signifikant gesteigerte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, JAM-1 (Junctional Adhesion Molecule-1), β_1 -Integrin, β_2 -Integrin, E-Cadherin und P-Selectin stattfindet (Moriconi et al. 2009). *In vitro*-Experimente an bestrahlten Hepatozyten (8 Gy) bestätigten diese Ergebnisse durch Nachweis der Mehrexpression von β_1 -Integrin, JAM-1 und ICAM-2 bei Bestrahlung isolierter Hepatozyten sowie nach Zugabe von TNF- α , IL-6 oder IL-1 β sowie TNF- α kombiniert mit IL-6 auch von ICAM-1, VCAM-1 und P-Selectin (Moriconi et al. 2009). Möglicherweise beeinflusst die strahlentherapeutische Zytokin-Expression dabei nicht nur die Inflammation sowie die Zellschädigungen sondern auch Stoffwechselforgänge, wie am Beispiel des Eisenstoffwechsels gezeigt werden konnte. So konnten Christiansen et al. *in vivo* aufzeigen, dass durch die Bestrahlung der Leber bzw. von Hepatozyten auch Heparin hochreguliert wird, ein Protein, das die Freisetzung von Eisen aus hepatischen Speichern und aus eisenbeladenen Makrophagen vermindert und das ebenfalls die intestinale Eisenresorption reduziert. Es gilt als Akute-Phase-Protein, das über seinen Rezeptor Ferroportin-1 als entscheidender Vermittler des Eisenmangels bei chronischen Entzündungsreaktionen fungiert (Christiansen et al. 2007; Ganz 2011). Diese Ergebnisse konnten ebenfalls durch *in vitro*-Untersuchungen bestätigt werden, in denen die Hochregulation von Heparin erneut nur unter Zugabe von TNF- α , IL-1 β und IL-6 stattfand (Christiansen et al. 2007). Auch wurde durch die Arbeitsgruppe im weiteren Verlauf bereits ein Modell zur chronischen RILD etabliert. Dabei wurde im Tiermodell eine selektive Hochdosis Einzelbestrahlung von 25 Gy mit einer fraktionierten Bestrahlung von 2 Gy/Tag und einer Gesamtdosis von 60 Gy verglichen, wie sie den klinischen Bestrahlungsmodalitäten beim Menschen am ehesten entspricht. Die makroskopischen Veränderungen der Leber und die Folgen der strahleninduzierten Entzündungsreaktionen unterscheiden sich dabei in der Langzeitbeobachtung nach drei Monaten interessanterweise nur punktuell (Rave-Fränk et al. 2013). Die Untersuchung pro-inflammatorischer Zytokine in diesem nun etablierten Langzeitmodell steht noch aus und könnte weiteren Aufschluss über ihre Bedeutung bei der RILD liefern. Auch sollten weitere *in vivo*-Experimente jetzt untersuchen, ob der Verlauf der strahleninduzierten Leberschädigung tatsächlich durch einen gezielten Eingriff in die herausgearbeiteten Pathomechanismen (z. B. Zytokin-Blockade, s.o.) positiv und ohne Beeinflussung des Tumorgewebes reguliert werden kann. Dazu könnten

Lebertumoren in den Tieren induziert werden, die anschließend unter Einsatz solcher Antikörper mit einer tumoriziden Strahlendosis in üblichen klinischen Dosis-/Fraktionierungsschemata bestrahlt werden. Erst nach Durchführung solcher Experimente wären erste klinische Studien mit dieser Fragestellung denkbar.

5 Zusammenfassung

Insbesondere im Rahmen interdisziplinärer, multimodaler onkologischer Therapiekonzepte gewinnt die Strahlentherapie bei der Behandlung primärer und sekundärer Lebertumoren sowie anderer maligner Oberbauchtumoren zunehmend an Bedeutung. Durch die Etablierung moderner Methoden der Hochpräzisionsbestrahlung, wie der stereotaktisch geführten Bestrahlung oder der interstitiellen Brachytherapie, kann heutzutage das gesunde Lebergewebe dabei immer besser geschont werden. Nichtsdestoweniger könnten höhere Strahlungsdosen die Effizienz der Therapien ggf. weiter verbessern. Die bekannte Strahlenempfindlichkeit der Leber stellt *in vivo* jedoch weiterhin einen limitierenden Faktor für mögliche weitere Dosissteigerungen dar, da das Auftreten einer klinisch manifesten strahleninduzierten Leberschädigung (*radiation-induced liver disease* - RILD) eine potenziell lebensbedrohliche Komplikation darstellt. Vor diesem Hintergrund ist im Rahmen aktueller experimenteller radioonkologischer Forschung die Aufklärung von Pathomechanismen der RILD von erheblicher Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dabei in einem *in vivo*-Modell gezeigt werden, dass es innerhalb von 48 Stunden nach Leberbestrahlung sowohl auf RNA- wie auch Proteinebene zu einer Hochregulation pro-inflammatorischer Zytokine kommt (TNF-alpha, IL-6, IL1-beta), die auch bei anderen strahleninduzierten Organschädigungen wie auch toxischen Leberschäden anderer Genese bekanntermaßen beteiligt sind. Möglicherweise spielen also Zell-Zell-Interaktionen über diese Zytokine auch bei der Pathogenese der RILD eine wichtige Rolle. Im verwendeten Tiermodell wurde dabei eine nicht-invasive, perkutane Bestrahlung durchgeführt, um einen Einfluss, z. B. eines invasiven Eingriffes auf die Zytokinexpression weitestgehend ausschließen zu können. Über welche Mechanismen die untersuchten Zytokine an der Pathogenese der RILD beteiligt sind, kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden. Dazu sind weitere experimentelle Untersuchungen notwendig. Ein in diesem Zusammenhang wichtiges experimentelles Modell zur Untersuchung der chronischen RILD wurde in nachfolgenden Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits etabliert, weitere Untersuchungen stehen noch aus. Ziel ist es, durch Aufklärung der Pathomechanismen Schutzmechanismen für das gesunde Gewebe zu entwickeln, um dieses bei der onkologischen Behandlung so schützen zu können, dass diese weiter optimiert werden kann.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von TNF-alpha auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen.....	29
Tabelle 2: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von IL-1 β auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen.....	31
Tabelle 3: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von IL-6 auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen.....	33
Tabelle 4: Serumkonzentrationen von TNF-alpha zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen	37
Tabelle 5: Serumkonzentrationen von IL-1 β zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen.....	39
Tabelle 6: Serumkonzentrationen von IL-6 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen.....	41

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von TNF-alpha auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen.....	30
Abbildung 2: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von IL-1 β auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen.....	32
Abbildung 3: Relative strahleninduzierte Expression (Real-Time PCR) von IL-6 auf RNA-Ebene in Relation zu unbestrahlten Kontrollen.....	34
Abbildung 4: Repräsentative Darstellung eines von insgesamt 3 Western Blots der Konzentrationen von TNF- α zu verschiedenen Zeitpunkten nach selektiver Leberbestrahlung auf Proteinebene im Western Blot, auch im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle	35
Abbildung 5: Repräsentative Darstellung eines von insgesamt 3 Western Blots der Konzentrationen von IL-1 β zu verschiedenen Zeitpunkten nach selektiver Leberbestrahlung auf Proteinebene im Western Blot, auch im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle	36
Abbildung 6: Repräsentative Darstellung eines von insgesamt 3 Western Blots der Konzentrationen von IL-6 zu verschiedenen Zeitpunkten nach selektiver Leberbestrahlung auf Proteinebene im Western Blot, auch im Vergleich zu einer unbestrahlten Kontrolle	36
Abbildung 7: Serumkonzentrationen von TNF-alpha zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen	38
Abbildung 8: Serumkonzentrationen von IL-1 β zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen	40
Abbildung 9: Serumkonzentrationen von IL-6 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung sowie bei unbestrahlten Kontrollen	42

8 Literaturverzeichnis

- Aitken KL, Hawkins MA (2015): Stereotactic body radiotherapy for liver metastases. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 27 (5), 307-15
- Alati T, Van Cleeff M, Strom SC, Jirtle RL (1988): Radiation sensitivity of adult human parenchymal hepatocytes. *Radiat Res* 115 (1), 152-160
- Argast GM, Campbell JS, Brooling JT, Fausto N (2004): Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. *J Biol Chem* 279 (33), 34530-6
- Badger DA, Sauer JM, Hoglen NC, Jolley CS, Sipes IG (1996): The role of inflammatory cells and cytochrome P450 in the potentiation of CCl₄-induced liver injury by a single dose of retinol. *Toxicol Appl Pharmacol* 141 (2), 507-519
- Bearman SI, Lee JL, Barón AE, McDonald GB (1997): Treatment of hepatic venoocclusive disease with recombinant human tissue plasminogen activator and heparin in 42 marrow transplant patients. *Blood* 89 (5), 1501-6
- Berber B, Ibarra R, Snyder L, Yao M, Fabien J, Milano MT, Katz AW, Goodman K, Stephans K, El-Gazzaz G et al. (2013): Multicentre results of stereotactic body radiotherapy for secondary liver tumours. *HPB (Oxford)* 15 (11), 851-857
- Blackham AU, Russell GB, Stewart JH 4th, Votanopoulos K, Levine EA, Shen P (2014): Metastatic colorectal cancer: survival comparison of hepatic resection versus cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 21 (8), 2667-74
- Bohlinger I, Leist M, Barsig J, Uhlig S, Tiegs G, Wendel A (1995): Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor necrosis factor alpha-induced liver injury through distinct pathways. *Hepatology* 22 (6), 1829-37
- Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C (1998): Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* 275 (3 Pt 1), G387-92
- Brandi G, Venturi M, Pantaleo MA, Ercolani G (2016): Cholangiocarcinoma: Current opinion on clinical practice diagnostic and therapeutic algorithms: A review of the literature and a long-standing experience of a referral center. *Dig Liver Dis* 48 (3), 231-241

Brunner TB, Grabenbauer GG, Meyer T, Golcher H, Sauer R, Hohenberger W (2007): Primary resection versus neoadjuvant chemoradiation followed by resection for locally resectable or potentially resectable pancreatic carcinoma without distant metastasis. A multi-centre prospectively randomised phase II-study of the Interdisciplinary Working Group Gastrointestinal Tumours (AIO, ARO, and CAO). *BMC Cancer* 7, 41

Cheng JC, Wu JK, Lee PC, Liu HS, Jian JJ, Lin YM, Sung JL, Jan GJ (2004): Biologic susceptibility of hepatocellular carcinoma patients treated with radiotherapy to radiation-induced liver disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 60 (5), 1502-1509

Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18 (24), 5294-9

Christiansen H, Saile B, Neubauer-Saile K, Tippelt S, Rave-Fränk M, Hermann RM, Dudas J, Hess CF, Schmidberger H, Ramadori G (2004): Irradiation leads to susceptibility of hepatocytes to TNF- α mediated apoptosis. *Radiother Oncol* 72 (3), 291-296

Christiansen H, Batusic D, Saile B, Hermann RM, Dudas J, Rave-Fränk M, Hess CF, Schmidberger H, Ramadori G (2006): Identification of Genes Responsive to Gamma Radiation in Rat Hepatocytes and Rat Liver by cDNA Array Gene Expression Analysis. *Radiat Res* 165 (3), 318-325

Christiansen H, Sheikh N, Saile B, Reuter F, Rave-Fränk M, Hermann RM, Dudas J, Hille A, Hess CF, Ramadori G (2007): X-Irradiation in rat liver: consequent upregulation of hepcidin and downregulation of hemojuvelin and ferroportin-1 gene expression. *Radiology* 242 (1), 189-97

Clancy TE, Meyerhardt JA (2013): Perioperative chemotherapy for colorectal cancer liver metastases. *Oncology (Williston Park)* 27 (11), 1088-90

Colletini F, Lutter A, Schnapauff D, Hildebrandt B, Puhl G, Denecke T, Wust P, Gebauer B (2014): Unresectable Colorectal Liver Metastases: Percutaneous Ablation Using CT-Guided High-Dose-Rate Brachytherapy (CT-HDBRT). *Fortschr Röntgenstr* 186, 606-612

Cosgrove BD, Cheng C, Pritchard JR, Stolz DB, Lauffenburger DA, Griffith LG (2008): An inducible autocrine cascade regulates rat hepatocyte proliferation and apoptosis responses to tumor necrosis factor-alpha. *Hepatology* 48 (1), 276-88

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, MAGIC Trial Participants (2006): Perioperative

chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 355 (1), 11-20

Dawson LA, Ten Haken RK, Lawrence TS (2001): Partial irradiation of the liver. *Semin Radiat Oncol* 11 (3), 240-246

Dawson LA, Normolle D, Balter JM, McGinn CJ, Lawrence TS, Ten Haken RK (2002): Analysis of radiation-induced liver disease using the Lyman NTCP model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53 (5), 810-821

Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin (2014): DGN-Handlungsempfehlung (S1-Leitlinie) Selektive intraarterielle Radiotherapie (SIRT) maligner Lebertumoren – AWMF-Registernummer: 031-048 [Stand: 31.12.2014]

Dietel M, Dudenhausen J, Suttrop N, (2003): *Harrisons Innere Medizin*, Bd. 1 und 2, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin 2003 15. Auflage

Dougados M, Kissel K, Conaghan PG, Mola EM, Schett G, Gerli R, Hansen MS, Amital H, Xavier RM, Troum O (2014): Clinical, radiographic and immunogenic effects after 1 year of tocilizumab-based treatment strategies in rheumatoid arthritis: the ACT-RAY study. *Ann Rheum Dis* 73 (5), 803-9

Duan H, Hoffmann M (2015): Selective internal radiotherapy (SIRT) of liver tumors. *Radio- loge* 55 (1), 48-52

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ (2006): Liver regeneration. *Hepatology* 43, 45-53

Galun E, Rose-John S (2013): The regenerative activity of interleukin-6. *Methods Mol Biol* 982, 59-77

Ganz T (2011): Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 117 (17), 4425-33

Geraci JP, Mariano MS (1993): Radiation hepatology of the rat: parenchymal and nonparenchymal cell injury. *Radiat Res* 136 (2), 205-213

Geraci JP, Mariano MS (1996): Radiation Hepatology of the Rat: Association of the Production of Prostacyclin with Radiation-Induced Hepatic Fibrosis. *Radiat Res* 145 (1), 93-97

Geraci JP, Jackson KL, Mariano MS (1985a): The intestinal radiation syndrome: sepsis and endotoxin. *Radiat Res* 101 (3), 442-50

Geraci JP, Jackson KL, Mariano MS, Leitch JM (1985b): Hepatic injury after whole-liver irradiation in the rat. *Radiat Res* 101 (3), 508-516

Geraci JP, Mariano MS, Jackson KL (1991): Hepatic radiation injury in the rat. *Radiat Res* 125 (1), 65-72

Geraci JP, Mariano MS, Jackson KL (1992): Radiation hepatology of the rat: microvascular fibrosis and enhancement of liver dysfunction by diet and drugs. *Radiat Res* 129 (3), 322-332

Goldberg SN, Ahmed M (2002): Minimally invasive image-guided therapies for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 35 (5 Suppl. 2), 115-129

Grundmann RT1, Hermanek P, Merkel S, Germer CT, Grundmann RT, Hauss J, Henne-Bruns D, Herfarth K, Hermanek P, Hopt UT; Arbeitsgruppe Workflow Diagnostik und Therapie von Lebermetastasen kolorektaler Karzinome (2008): Diagnosis and treatment of colorectal liver metastases - workflow. *Zentralbl Chir* 133 (3), 267-84

Guha C, Kavanagh BD (2011): Hepatic Radiation Toxicity: Avoidance and Amelioration. *Semin Radiat Oncol* 21 (4), 256-263

Halme J, Sachse M, Vogel H, Giese T, Klar E, Kirschfink M (2009): Primary human hepatocytes are protected against complement by multiple regulators. *Mol Immunol* 46 (11-12), 2284-9

Hass P, Mohnike K (2014): Extending the Frontiers Beyond Thermal Ablation by Radiofrequency Ablation: SBRT, Brachytherapy, SIRT (Radioembolization). *Viszeralmedizin* 30 (4), 245-52

Hofman H (1998): Experimentelle Untersuchung zur Gentoxizität von Aromastoffen. *Biol. Dipl.-Arbeit Kaiserslautern* 1998

Holzman DC (2010): Pancreatic cancer: will incremental advances begin to make a difference? *J Natl Cancer Inst* 102, 1821-3

Hurt CN, Mukherjee S, Bridgewater J, Falk S, Crosby T, McDonald A, Joseph G, Staffurth J, Abrams RA, Blazeby JM (2015): Health-Related Quality of Life in SCALOP, a Randomized Phase 2 Trial Comparing Chemoradiation Therapy Regimens in Locally Advanced Pancreatic Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 93 (4), 810-8

Ingold JA, Reed GB, Kaplan HS, Bagshaw MA (1965): Radiation Hepatitis. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 93, 200-208

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011): Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 61, 69-90

- Jirtle RL, Michalopoulos G, Strom SC, DeLuca PM, Gould MN (1984): The survival of parenchymal hepatocytes irradiated with low and high LET radiation. *Br J Cancer* 6, 197-201
- Jirtle RL, Anscher MS, Alati T (1990): Radiation sensitivity of the liver. *Adv Radiat Biol* 14, 269-311
- Jung J, Yoon SM, Kim SY, Cho B, Park JH, Kim SS, Song SY, Lee SW, Ahn SD, Choi EK (2013): Radiation-induced liver disease after stereotactic body radiotherapy for small hepatocellular carcinoma: clinical and dose-volumetric parameters. *Radiat Oncol* 8, 249
- Kasper HU, Drebber U, Dries V, Dienes HP (2005): Liver metastases: incidence and histogenesis. *Z Gastroenterol* 43 (10), 1149-57
- Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K (1968): Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 9, 279-90
- Klöpffel G (2011): Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer* 18 (1), 1-16
- Koch RR, Glende EA Jr, Recknagel RO (1974): Hepatotoxicity of bromotrichloromethane-bond dissociation energy and lipoperoxidation. *Biochem Pharmacol* 23 (20), 2907-2915
- Kubes P, Mehal WZ (2012): Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology* 143 (5), 1158-72
- Kuo ML, Chuang SE, Lin MT, Yang SY (2001): The involvement of PI 3-K/Akt-dependent up-regulation of Mcl-1 in the prevention of apoptosis of Hep3B cells by interleukin-6. *Oncogene* 20 (6), 677-85
- Lee WH, Sonntag WE, Mitschelen M, Yan H, Lee YW (2010): Irradiation induces regionally specific alterations in pro-inflammatory environments in rat brain. *Int J Radiat Biol* 86 (2), 132-44
- Leitlinie Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs. Langversion 1.0, 2012, AWMF Registernummer: 032-009OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.htm> [Stand: 15.02.2012]
- Leitlinie Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms. Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-053OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> [Stand: 01.05.2013]
- Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0, 2013, AWMF Registernummer: 032-

- 0100L, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.htm> [Stand: 31.10.2013]
- Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021-007OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> [Stand: 14.06.2013]
- Liu B, Li X, Ai F, Wang T, Chen Y, Zhang H (2015): The influence of radiotherapy on IL-2 and IL-6 secretions of mucous membrane epithelial cells of wistar small intestine. *Cell Biochem Biophys* 71 (1), 35-8
- Liu E, Stenmark MH, Schipper MJ, Balter JM, Kessler M, Caoili EM, Lee OE, Ben-Josef E, Lawrence T, Feng M (2013): Stereotactic Body Radiation Therapy for Primary and Metastatic Liver Tumors. *Transl Oncol* 6 (4), 442-446
- Lutz A, Sanwald J, Thomas M, Feuer R, Sawodny O, Ederer M, Borner C, Humar M, Merfort I (2014): Interleukin-1 β enhances FasL-induced caspase-3/-7 activity without increasing apoptosis in primary mouse hepatocytes. *PLoS One* 9 (12), e115603
- Maluccio M, Covey A (2012): Recent Progress in Understanding, Diagnosing, and Treating Hepatocellular Carcinoma. *CA Cancer J Clin* 62 (6), 394-399
- Moir JA, Burns J, Barnes J, Colgan F, White SA, Littler P, Manas DM, French JJ (2015): Selective internal radiation therapy for liver malignancies. *Br J Surg* 102 (12), 1533-40
- Moriconi F, Malik I, Ahmad G, Dudas J, Rave-Fränk M, Vorwerk H, Hille A, Hess CF, Ramadori G, Christiansen H (2009): Effect of irradiation on gene expression of rat liver adhesion molecules: in vivo and in vitro studies. *Strahlenther Onkol* 185 (7), 460-8
- Mossanen JC, Tacke F (2015): Acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Lab Anim* 49 (1 Suppl), 30-6
- Nishikawa H, Kimura T, Kita R, Osaki Y (2013): Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Int J Hyperthermia* 29 (6), 558-568
- Ong ZY, Gibson RJ, Bowen JM, Stringer AM, Darby JM, Logan RM, Yeoh AS, Keefe DM (2010): Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Radiat Oncol* 5, 22
- Oyagbemi AA, Azeez OI, Saba AB (2010): Hepatocellular carcinoma and the underlying mechanisms. *Afr Health Sci* 10 (1), 93-98
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 45

- Plümpe J, Streetz K, Manns MP, Trautwein C (1999): Tumour necrosis factor alpha-mediator of apoptosis and cell proliferation of hepatocytes. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 31, 235-243
- Preuss R: Lebertumoren. In: Renz-Polster H, Krautzig S (Hrsg.): *Basislehrbuch Innere Medizin*. 5. Auflage; Urban & Fischer, München 2012, 685-688
- Rajagopalan MS, Heron DE, Wegner RE, Zeh HJ, Bahary N, Krasinskas AM, Lembersky B, Brand R, Moser AJ, Quinn AE (2013): Pathologic response with neoadjuvant chemotherapy and stereotactic body radio-therapy for borderline resectable and locally-advanced pancreatic cancer. *Radiat Oncol* 8, 254
- Ramadori G, Meyer zum Büschenfelde KH (1989): Acute phase reaction and its mediators. *Z Gastroenterol* 27 (12), 746-50
- Ramadori G, Christ B (1999): Cytokines and the Hepatic Acute-Phase Response. *Semin Liver Dis* 19 (2), 141-155
- Ramadori G, Armbrust T (2001): Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13, 777-784
- Ramadori G, Sipe JD, Colten HR (1985): Expression and regulation of the murine serum amyloid A (SAA) gene in extrahepatic sites. *J Immunol* 135 (6), 3645-7
- Rauchfuß F, Settmacher U (2015): Leberteilresektion beim intrahepatischen Cholangiokarzinom. *Chirurg* 86, 185
- Rave-Fränk M, Malik IA, Christiansen H, Naz N, Sultan S, Amanzada A, Blaschke M, Cameron S, Ahmad S, Hess CF, (2013): Rat model of fractionated (2 Gy/day) 60 Gy irradiation of the liver: long-term effects. *Radiat Environ Biophys* 52 (3), 321-38
- Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL (1989): Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 43 (1), 139-54
- Reed GB, Cox AJ (1966): The human liver after radiation injury. A form of veno-occlusive disease. *Am J Pathol* 48 (4), 597-611
- RKI, GKID (Hrsg.): *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin 2013
- Rübe CE, Rodemann HP, Rübe C (2004): Die Bedeutung von Zytokinen für die radiogene Lungenreaktion. *Strahlenther Onkol* 180 (9), 541-549

Rübe CE, Uthe D, Wilfert F, Ludwig D, Yang K, König J, Palm J, Schuck A, Willich N, Remberger K (2005): The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61 (5), 1482-92

Rühl R, Lüdemann L, Czarnecka A, Streitparth F, Seidensticker M, Mohnike K, Pech M, Wust P, Ricke J (2010): Radiobiological restrictions and tolerance doses of repeated single-fraction HDR-irradiation of intersecting small liver volumes for recurrent hepatic metastases. *Radiat Oncol* 5, 44

Rusthoven KE, Kavanagh BD, Cardenes H, Stieber VW, Burri SH, Feigenberg SJ, Chidel MA, Pugh TJ, Franklin W, Kane M (2009): Multi-institutional phase I/II trial of stereotactic body radiation therapy for liver metastases. *J Clin Oncol* 27 (10), 1572-1578

Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, Travers S, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR (2005): Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 353 (23), 2462-76

Rutgeerts P, Feagan BG, Marano CW, Padgett L, Strauss R, Johanns J, Adedokun OJ, Guzzo C, Zhang H, Colombel JF; PURSUIT-IV study group (2015): Randomised clinical trial: a placebo-controlled study of intravenous golimumab induction therapy for ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 42 (5), 504-14

S3-Leitlinie siehe Leitlinie

Schlaf G, Demberg T, Koleva M, Jungermann K, Götze O (2001): Complement factor I is upregulated in rat hepatocytes by interleukin-6 but not by interferon-gamma, interleukin-1beta, or tumor necrosis factor-alpha. *Biol Chem* 382 (7), 1089-94

Selçukbiricik F, Tural D, Elicin O, Berk S, Özgüroğlu M, Bese N, Ferhanoglu B (2012): Primary gastric lymphoma: conservative treatment modality is not inferior to surgery for early-stage disease. *ISRN Oncol Article ID 951816*, 6 pages

Settmacher U, Scheuerlein H, Rauchfuss F (2014): Assessment of resectability of colorectal liver metastases and extended resection. *Chirurg* 85 (1), 24-30

Shaib Y, El-Serag HB (2004): The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 24 (2), 115-25

Sharma S, Eckert D, Hyams JS, Mensing S, Thakkar RB, Robinson AM, Rosh JR, Ruemmele FM, Awni WM (2015): Pharmacokinetics and exposure-efficacy relationship of adalimumab in pediatric patients with moderate to severe Crohn's disease: results from a randomized, mul-

ticenter, phase-3 study. *Inflamm Bowel Dis* 21 (4), 783-92

Shim SJ, Seong J, Lee IJ, Han KH, Chon CY, Ahn SH (2007): Radiation-induced hepatic toxicity after radiotherapy combined with chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 37 (11), 906-13

Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, Hundahl SA, Estes NC, Ajani JA, Gunderson LL, Goldman B, Martenson JA, Jessup JM (2012): Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. *J Clin Oncol* 30 (19), 2327-33

Streetz KL, Tacke F, Leifeld L, Wüstefeld T, Graw A, Klein C, Kamino K, Spengler U, Kreipe H, Kubicka S (2003): Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology* 38 (1), 218-29

Stuart K (2003): Chemoembolization in the Management of Liver Tumors. *Oncologist* 8 (5), 425-437

Takehara T, Hayashi N, Tatsumi T, Kanto T, Mita E, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M (1999): Interleukin 1beta protects mice from Fas-mediated hepatocyte apoptosis and death. *Gastroenterology* 117 (3), 661-8

Tanguturi SK, Wo JY, Zhu AX, Dawson LA, Hong TS (2014): Radiation therapy for liver tumors: Ready for inclusion in guidelines? *Oncologist* 19 (8), 868-79

Tao C, Yang LX (2012): Improved radiotherapy for primary and secondary liver cancer: stereotactic body radiation therapy. *Anticancer Res* 32 (2), 649-55

Tuñón MJ, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J (2009): An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol* 15 (25), 3086-98

Van Laethem JL, Hammel P, Mornex F, Azria D, Van Tienhoven G, Vergauwe P, Peeters M, Polus M, Praet M, Mauer M (2010): Adjuvant gemcitabine alone versus gemcitabine-based chemoradiotherapy after curative resection for pancreatic cancer: a randomized EORTC-40013-22012/FFCD-9203/GERCOR phase II study. *J Clin Oncol* 28 (29), 4450-6

Vogl TJ, Zegelman A, Bechstein WO, Zeuzem S, Zangos S (2013): Treatment of liver metastases of colorectal carcinoma: overview of hyperthermal ablation methods. *Dtsch Med Wochenschr* 138 (15), 792-8

Wadleigh M, Ho V, Momtaz P, Richardson P. (2003): Hepatic veno-occlusive disease: patho-

genesis, diagnosis and treatment. *Curr Opin Hematol* 10 (6), 451-62

Weber LW, Boll M, Stampfl A (2003): Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 33 (2), 105-36

Wertheimer SJ, Myers CL, Wallace RW, Parks TP (1992): Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor- α and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* 267 (17), 12030-12035

World Cancer Research Fund International (2016): <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data> [Stand: Januar 2016]

Xie W, Sun J, Zhang X, Melzig MF (2014): Necrosis factor- α (TNF- α) response in human hepatoma HepG2 cells treated with hepatotoxic agents. *Pharmazie* 69 (5), 379-84

Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N (1997): Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1441-1446

Yang F, Li X, Wang LK, Wang LW, Han XQ, Zhang H, Gong ZJ (2014): Inhibitions of NF- κ B and TNF- α result in differential effects in rats with acute on chronic liver failure induced by d-Gal and LPS. *Inflammation* 37 (3), 848-57

Yoritsune E, Furuse M, Kuwabara H, Miyata T, Nonoguchi N, Kawabata S, Hayasaki H, Kuroiwa T, Ono K, Shibayama Y (2014): Inflammation as well as angiogenesis may participate in the pathophysiology of brain radiation necrosis. *J Radiat Res* 55 (4), 803-11

Yoshigai E, Hara T, Inaba H, Hashimoto I, Tanaka Y, Kaibori M, Kimura T, Okumura T, Kwon AH, Nishizawa M (2014): Interleukin-1 β induces tumor necrosis factor- α secretion from rat hepatocytes. *Hepatol Res* 44 (5), 571-83

You Q, Holt M, Yin H, Li G, Hu CJ, Ju C (2013): Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury. *Biochem Pharmacol* 86 (6), 836-43

Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F (2012): Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol* 3, 56

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. med. C. F. Hess danke ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in seiner Abteilung durchführen zu können.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ramadori, der die Zusammenarbeit mit der Abteilung Gastroenterologie ermöglicht und unterstützt hat. Ohne die Unterstützung der Abteilung Gastroenterologie und die international hohe Expertise von Professor Dr. med. Dr. h.c. G. Ramadori auf dem Gebiet der Hepatologie wäre die vorliegende Arbeit nicht umzusetzen gewesen.

Weiterhin möchte ich Frau Dipl. Biol. M. Rave-Fränk danken, die mir während der experimentellen Arbeiten und der statistischen Auswertung stets zur Seite stand.

Frau J. Kasten-Krapp und Frau Dr. rer. nat. H. Hofman-Hüther danke ich für die stets freundliche und engagierte Hilfe im Labor.

Für die tatkräftige und angenehme Unterstützung in den Laboren der Gastroenterologie möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Zachmann, Sandra Georgi, Christin Hoffmann und besonders auch Dr. Jozsef Dudas bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Christiansen, der durch seine engagierte und ausdauernde Betreuung, viel Geduld und motivierende Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat und an der Korrektur der vorliegenden Dissertationsschrift maßgeblich beteiligt war.

Lebenslauf

Am 22.11.1979 wurde ich, Franz Felix Reuter als Sohn von Dr. rer. pol. Hildegard Reuter, geborene Beermann, und Dr. med. Gernot Reuter in München geboren.

Von 1986 bis 1988 besuchte ich die Walther-Hensel-Grundschule in Göppingen und von 1988 bis 1990 die Grundschule am Canisiusplatz in München. Von 1990 bis 1999 besuchte ich das humanistische Maximiliansgymnasium München. Dort erlangte ich 1999 die Allgemeine Hochschulreife.

Von Oktober 1999 bis August 2000 leistete ich meinen Zivildienst im Krankenhaus München Schwabing in der Abteilung für Radiologie und in der Kinderklinik.

Im Oktober 2000 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen und legte hier im September 2002 die Ärztliche Vorprüfung, im August 2003 den Ersten und im März 2006 den Zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung ab.

Seit 2003 war ich als Doktorand in der Abteilung für Strahlentherapie und Radioonkologie der Georg-August-Universität Göttingen tätig, in dieser Zeit erarbeitete ich die Daten, die die Grundlage der vorliegenden Arbeit darstellen.

Das Praktische Jahr absolvierte ich von April 2006 bis April 2007 an den Kliniken der Ludwig-Maximilians-Universität in München und schloss das Studium dort im April 2007 mit dem Dritten Teil der Ärztlichen Prüfung und der Gesamtnote 2,16 erfolgreich ab.

Von Januar 2008 bis März 2015 absolvierte ich die Weiterbildung im Fachgebiet der Neurochirurgie als Assistenzarzt in der Abteilung für Neurochirurgie der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Murnau und erlangte im Februar 2015 die Bezeichnung „Facharzt für Neurochirurgie“.

Im Jahr 2009 heiratete ich meine Frau Dr. med. Nadine Reuter, geborene Kastrup. In diesem Jahr wurde auch mein Sohn Gustav Leopold geboren, 2012 meine Tochter Luisa Johanna.

Seit April 2015 bin ich als Facharzt in der Klinik für Neurochirurgie des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder in Regensburg tätig.