

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
(Prof. Dr. med. M. Ghadimi)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Lokoregionäre Therapie kolorektaler
Lebermetastasen im Rattenmodell:
Immunhistochemische Differenzierung von
DNA- und Hypoxie-induzierten Schäden
nach Applikation von Embolisatpartikeln**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hannah Sophie Nowack

aus

Göttingen

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. M. Ghadimi

Ko-Betreuer: PD Dr. A. Amanzada

Prüfungskommission

Referentin: Prof. Dr. M. Ghadimi

Ko-Referent: PD Dr. A. Amanzada

Drittreferent: PD Dr. F. Bremmer

Datum der mündlichen Prüfung: 28.04.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Lokoregionäre Therapie kolorektaler Lebermetastasen im Rattenmodell: Immunhistochemische Differenzierung von DNA- und Hypoxie-induzierten Schäden nach Applikation von Embolisatpartikeln" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 03.06.2019

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das kolorektale Karzinom	1
1.1.1 Standardtherapie des KRK	1
1.1.2 Lebensqualität unter Chemotherapie	3
1.2 Lokoregionäre Therapie	4
1.2.1 Hepatoarterielle Infusion	4
1.2.2 Transarterielle Chemoembolisation.....	6
1.3 Zytostatika	8
1.3.1 Irinotecan.....	8
1.3.1.1 Humaner Metabolismus	8
1.3.1.2 Metabolismus in der Ratte	9
1.3.2 Nanoliposomales Irinotecan.....	9
1.4 Embolisatpartikel.....	10
1.4.1 EmboCept® S	10
1.4.2 Tandem™ 40 µm	10
1.5 Klinische Einordnung.....	11
1.6 Ziel der Studie.....	12
2 Material	13
2.1 Verbrauchsmaterialien	13
2.2 Chemikalien	14
2.3 Geräte	15
2.4 Zelllinie.....	17
2.5 Zellkulturreagenzien.....	17
2.6 Versuchstiere.....	18
2.7 Materialien zur Tierhaltung.....	18
2.8 Medikamente.....	18
2.9 Antikörper	18
2.9.1 Primärantikörper.....	18
2.9.2 Sekundärantikörper.....	19
2.10 Puffer, Lösungen.....	19
2.11 Kits.....	22
2.12 Software	22

3	Methoden	23
3.1	Zellkultur	23
3.1.1	Kultivierung und Passagieren der Zelle	23
3.1.2	Zellzahlbestimmung.....	24
3.2	Versuchsabschnitt I: <i>In-vitro</i> -Versuche	25
3.2.1	<i>In-vitro</i> -Behandlung der Zellen mit Irinotecan	25
3.2.2	Proteinisolation.....	25
3.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	25
3.2.4	Western Blot.....	26
3.2.4.1	SDS-PAGE	27
3.2.4.2	Western Blot.....	28
3.2.4.3	Gel-Färbung.....	28
3.2.4.4	Immunfärbung.....	29
3.2.4.5	Detektion	30
3.3	Rattenmodell	31
3.3.1	Versuchstiere.....	31
3.4	Versuchsabschnitt II: Bestimmung der molekularen Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung.....	32
3.4.1	Zeitlicher Ablauf.....	32
3.4.2	Tumorimplantation	33
3.4.3	Hepatoarterielle Infusion	34
3.4.4	Systemische Applikation	36
3.4.5	Gewebeentnahme.....	36
3.4.6	Protokoll	37
3.4.6.1	Irinotecan-Gruppe	37
3.4.6.2	Onivyde®-Gruppe.....	37
3.4.7	Histologie.....	38
3.4.7.1	Anfertigung von Schnitten.....	38
3.4.7.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	38
3.4.7.3	Immunhistochemische Färbung	39
3.5	Versuchsabschnitt III: Bestimmung des Tumoransprechens	44
3.5.1	Zeitlicher Ablauf.....	44
3.5.2	Tumorimplantation	44
3.5.3	Tumorvolumenbestimmung.....	45
3.5.4	Hepatoarterielle Infusion	45
3.5.5	Gewebeentnahme.....	45
3.5.6	Protokoll	46
3.5.7	Histologie.....	47
3.5.7.1	Anfertigung von Schnitten.....	47
3.5.7.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	47
3.5.7.3	Immunhistochemische Färbung	48
3.6	Statistische Auswertung.....	50
4	Ergebnisse.....	51
4.1	Versuchsabschnitt I: <i>In-vitro</i> -Versuche	51

4.1.1	Proliferation.....	51
4.1.2	Hypoxie.....	52
4.1.3	Apoptose.....	53
4.2	Tiermodell.....	54
4.3	Versuchsabschnitt II: Bestimmung der molekularen Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung.....	54
4.3.1	Irinotecan-Gruppe	54
4.3.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	54
4.3.1.2	Immunhistochemische Färbung	55
4.3.2	Onivyde®-Gruppe.....	62
4.3.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	62
4.3.2.2	Immunhistochemische Färbung	63
4.4	Versuchsabschnitt III: Bestimmung des Tumoransprechens	69
4.4.1	Tumorvolumenbestimmung.....	69
4.4.1.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	70
4.4.1.2	Zellschädigung	71
4.4.2	Immunhistochemische Färbung	72
4.4.2.1	Proliferation.....	72
4.4.2.2	DNA-Schäden.....	74
4.4.2.3	Hypoxie.....	76
4.4.2.4	Angiogenese	78
4.4.2.5	Apoptose.....	80
5	Diskussion.....	82
5.1	Material und Methoden	82
5.2	Versuchsabschnitt I: <i>In-vitro</i> -Versuche	84
5.3	Versuchsabschnitt II: Bestimmung der molekularen Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung.....	85
5.3.1	Irinotecan-Gruppe	85
5.3.2	Onivyde®-Gruppe.....	88
5.4	Versuchsabschnitt III: Bestimmung des Tumoransprechens	90
5.5	Fazit	93
5.5.1	Fragestellung	93
5.5.2	Schlussfolgerung.....	94
6	Zusammenfassung.....	95
7	Publikationen	97
7.1	Kongressbeiträge	97
7.1.1	21. Chirurgische Forschungstage vom 21.-23. September 2017 in Köln.....	97
7.1.2	EKFS Cancer Symposium 2017 vom 15.-17. November in Göttingen.....	97
7.1.3	135. Kongress Deutsche Gesellschaft für Chirurgie vom 17.-20. April 2018 in Berlin.....	98
7.2	Originalarbeit	98
8	Literaturverzeichnis	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Platzierung und Auffüllung des perkutanen, hepatoarteriellen Pumpsystems.....	4
Abbildung 2: Transarterielle Chemoembolisation.....	6
Abbildung 3: Metabolismus von Irinotecan.....	9
Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Western Blots (<i>semi-dry</i>).....	28
Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf des Versuchsabschnitts II.....	32
Abbildung 6: Tumorimplantation.....	33
Abbildung 7: Schematische Darstellung der hepatoarteriellen Infusion.....	34
Abbildung 8: Hepatoarterielle Infusion.....	35
Abbildung 9: Schematische Darstellung der systemischen Applikation in die <i>Vena cava inferior</i>	36
Abbildung 10: HE-Färbung des Tumors und des angrenzenden Lebergewebes.....	38
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen.....	40
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen γ H2AX.....	41
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen HIF-1 α	42
Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen CASPASE-3.....	43
Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf des Versuchsabschnitts III.....	44
Abbildung 16: Tumorummetrie mittels Kleintierultrasonographie.....	45
Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung der GefäÙe mit dem Antikörper gegen PECAM-1.....	49
Abbildung 18: Analyse der Expression von PCNA in CC531-Zellen nach 72-stündiger Inkubation.....	51
Abbildung 19: Analyse des Western Blots im Hinblick auf die Expression von HIF-1 α in CC531-Zellen nach 72-stündiger Inkubation.....	52
Abbildung 20: Expression von <i>cleaved</i> CASPASE-3 in CC531-Zellen nach 72-stündiger Inkubation.....	53
Abbildung 21: HE-Färbung des Tumor- und des angrenzenden Lebergewebes.....	54
Abbildung 22: Analyse der PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF.....	55
Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen PCNA.....	56
Abbildung 24: (A) Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe. (B)-(F): Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen γ H2AX.....	57
Abbildung 25: Analyse der HIF-1 α -positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF.....	58
Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen HIF-1 α	59
Abbildung 27: Anzahl der CASPASE-3-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe.....	60
Abbildung 28: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen CASPASE-3.....	61
Abbildung 29: HE-Färbung des Tumor- und des angrenzenden Lebergewebes.....	62
Abbildung 30: (A) Analyse der PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF (B)-(E): Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen PCNA.....	63

Abbildung 31: (A) Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe. (B)-(E): Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen γ H2AX.....	64
Abbildung 32: Analyse der HIF-1 α -positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF.....	65
Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen HIF-1 α	66
Abbildung 34: Anzahl der CASPASE-3-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe.....	67
Abbildung 35: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen CASPASE-3.....	68
Abbildung 36: Prozentuale Veränderung des Tumolvolumens von Tag 10 zu Tag 13.....	69
Abbildung 37: HE-Färbung eines Tumors und angrenzendem Lebergewebe.....	70
Abbildung 38: HE-Färbung des Tumor- und des angrenzenden Lebergewebes.....	70
Abbildung 39: Analyse der Hepatozytenschädigung in Hinblick auf Vakuolisierung (A), Groscholligkeit des Zytoplasmas (B) und Zellkerndeformationen (C). (D)-(E) Abbildung einer Groscholligkeit (F)-(G) Abbildung Vakuolisierung.....	71
Abbildung 40: Analyse der PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF	72
Abbildung 41: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen PCNA	73
Abbildung 42: Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe.....	74
Abbildung 43: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen γ H2AX.....	75
Abbildung 44: (A) Analyse der HIF-1 α -positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF. (B) Analyse der HIF-1 α -positiven Zellen im gesunden Lebergewebe pro HPF	76
Abbildung 45: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen HIF-1 α	77
Abbildung 46: (A) Anzahl der PECAM-1-positiven Gefäße pro HPF des Tumorgewebes. (B) Anzahl der PECAM-1-positiven Gefäße pro HPF des gesunden Lebergewebes.	78
Abbildung 47: Immunhistochemische Färbung der Gefäße mit dem Antikörper gegen PECAM-1.....	79
Abbildung 48: Anzahl der CASPASE-3-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe.....	80
Abbildung 49: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen CASPASE-3.....	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: UICC-Stadien des KRK und 5-ÜLR	2
Tabelle 2: Zusammensetzung für 3 Minigele bestehend aus Trenn- und Sammelgel.....	27
Tabelle 3: Verwendete Primäntikörper mit Verdünnungen und Inkubationszeiten.....	29
Tabelle 4: Verwendete Sekundäntikörper mit Verdünnungen und Inkubationszeiten	29
Tabelle 5: Behandlungsgruppen der Irinotecan-Gruppe des Versuchsabschnitts II.....	37
Tabelle 6: Behandlungsgruppen der Onivyde®-Gruppe des Versuchsabschnitts II.....	37
Tabelle 7: Behandlungsgruppen des Versuchsabschnitts III	46

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
5-ÜLR	5-Jahres-Überlebensrate
APC	7-Ethyl-10-[4-N-(5-Aminopentanoic Säure)-1-Piperidino]- Carbonyloxycamptothecin
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin (Kälberserumalbumin)
CASPASE-3	<i>cysteine-dependent aspartate-specific protease-3</i>
CC1	<i>cell conditioner 1</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CPT-11	Irinotecan
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
DAB	Diaminobenzin
DEB	<i>drug-eluting beads</i>
Destatis	Statistisches Bundesamt
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DSM	<i>degradable starch microsphere</i> (abbaubare Stärkemikrosphären)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EPR-Effekt	<i>enhanced-permeability-and retention-effect</i> (erhöhte-Permeabilität-und- Retention-Effekt)
FBS	fetales bovines Serum (fetales Kälberserum)
FOLFIRI	5-FU+Irinotecan+Folinsäure
FOLFOX	5-FU+Oxaliplatin+Folinsäure
FOLFOXIRI	5-FU+Irinotecan+Oxaliplatin+Folinsäure
FUDR	Floxuridin
HAI	Hepatoarterielle Infusion
HAI IRI	HAI mit Irinotecan
HAI Embo	HAI mit EmboCept® S
HAI Embo + IRI	HAI mit EmboCept® S und Irinotecan
HAI Embo + nal IRI	HAI mit EmboCept® S und nanoliposomalem Irinotecan (Onivyde®)
HAI nal IRI	HAI mit nanoliposomalen Irinotecan (Onivyde®)
HAI Tandem + IRI	HAI mit Tandem™40 µm und Irinotecan
HCC	<i>Hepatocellular Carcinoma</i> (Hepatozelluläres Karzinom)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1α
HPF	<i>high power field</i> (Gesichtsfeld)
IHC	Immunhistochemische Färbung
<i>i.p.</i>	intraperitoneal

KRK	kolorektales Karzinom
KRLM	kolorektale Lebermetastasen
KG	Körpergewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NPC	7-Ethyl-10-[4-(1-Piperidino)-1-Amino]-Carbonyloxycamptothecin
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Polyacrylamidgelelektrophorese)
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RR	<i>response rate</i> (Ansprechrage)
<i>s.c.</i>	subkutan
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SN-38	7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin
SYS IRI	systemische Applikation von Irinotecan
SYS nal IRI	systemische Applikation von nanoliposomalen Irinotecan (Onivyde®)
T	Temperatur
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TBS-Puffer	<i>tris-buffered-saline</i> -Puffer
TBS-T-Puffer	<i>tris-buffered-saline</i> + 0,1 % Tween® 20-Puffer
TNM	Tumor, <i>node</i> , Metastasen
ü. N.	über Nacht
UICC	Union Internationale Contre Le Cancer (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) zählt in Deutschland mit über 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr zu der am dritthäufigsten diagnostizierten Krebsentität. Jährlich sterben etwa 16.000 Patienten an den Folgen der Erkrankung (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2015).

Durch verbesserte und neue Therapieansätze konnte die altersstandardisierte Sterberate in den letzten zehn Jahren um mehr als 20 % gesenkt und die 5-Jahres-Überlebensrate (5-ÜLR) von 45 % (1980) auf 63 % (2012) gesteigert werden (Krebs in Deutschland 2011/2012).

1.1.1 Standardtherapie des KRK

Die Therapie des KRK erfolgt in Deutschland anhand der S3-Leitlinien des Leitlinienprogramms Onkologie 2014 der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. Die Stadien des KRK werden von der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (Union Internationale Contre Le Cancer, UICC) nach der TNM (Tumor, *node*, Metastasen)-Klassifikation in fünf UICC-Stadien eingeteilt (s. Tabelle 1). Die Therapie ist abhängig vom UICC-Stadium sowie bestimmten Prognosefaktoren, z. B. Notfallbehandlung oder Tumorperforation. Auch wird in der Behandlung zwischen Kolon- und Rektumkarzinom unterschieden (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014).

Patienten im UICC-Stadium I und II A sind durch die operative Entfernung des Primärtumors mit begleitender Lymphadenektomie kurativ behandelbar (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014). Die 5-ÜLR der Patienten im Stadium I liegt bei ca. 90 % (Resch und Thaler 2011). Patienten mit einem Kolonkarzinom im UICC-Stadium II B oder III sollten zusätzlich eine adjuvante Chemotherapie erhalten. Eine neoadjuvante Radio- oder Radiochemotherapie zur lokalen Tumorreduktion wird Patienten mit einem Rektumkarzinom im UICC-Stadium II und III vor der Tumorresektion empfohlen (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014).

Tabelle 1: UICC-Stadien des KRK und 5-ÜLR (nach Resch und Thaler 2011; Brierley 2017).

Tis = Carcinoma in situ, T1 = Tumor infiltriert Submukosa, T2 = Tumor infiltriert *Muscularis propria*, T3 = Tumor infiltriert Subserosa oder perikolisch/perirektales Gewebe, T4a = Tumor infiltriert viszerales Peritoneum T4b = Tumor infiltriert direkt andere Organe oder Strukturen. N0 = Keine regionären Lymphknotenmetastasen, N1 = Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten, N2 = Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten, N2a = Metastasen in 4 bis 6 regionären Lymphknoten, N2b = Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten. M0 = Keine Fernmetastasen, M1 = Fernmetastasen, M1a = Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten), ohne Peritonealmetastasen, M1b = Metastasen in mehr als einem Organ, M1c = Metastasen im Peritoneum mit/ohne Metastasen in anderen Organen.

UICC	TNM			5-ÜLR
0	Tis	N0	M0	
I	T1, T2	N0	M0	93,20 %
II	T3, T4	N0	M0	
II A	T3	N0	M0	84,70 %
II B	T4a	N0	M0	72,20 %
II C	T4b	N0	M0	
III	Jedes T	N1, N2	M0	
III A	T1, T2	N1	M0	83,40 %
	T1	N2a	M0	
III B	T1, T2	N2b	M0	64,10 %
	T2, T3	N2a	M0	
	T3, T4a	N1	M0	
III C	T3, T4a	N2b	M0	44,30 %
	T4a	N2a	M0	
	T4b	N1, N2	M0	
IV	Jedes T	Jedes N	M1	8,10 %
IV A	Jedes T	Jedes N	M1a	
IV B	Jedes T	Jedes N	M1b	
IV C	Jedes T	Jedes N	M1c	

Allerdings sind bereits bei 25 % der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose kolorektale Lebermetastasen (KRLM) klinisch nachweisbar, und etwa 50 % der Patienten entwickeln im Verlauf KRLM (De Greef et al. 2016). Das Vorliegen von KRLM und/oder anderen Fernmetastasen ist prognosebestimmend (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014). Das mediane Überleben von Patienten mit unbehandelten KRLM beträgt 8 Monate. Der einzige kurative Therapieansatz beim Vorhandensein von KRLM besteht aktuell in der vollständigen chirurgischen Resektion derselben. Vor diesem Hintergrund werden Patienten mit KRLM in drei Subgruppen eingeteilt: Patienten mit primär resektablen,

Patienten mit zunächst irresektablen, aber potentiell resektablen und Patienten mit irresektablen Metastasen (De Greef et al. 2016).

Eine primäre Resektion ist jedoch nur bei 10-20 % der Patienten mit KRLM möglich. Nach erfolgreicher Resektion liegt die 5-ÜLR in dieser Subpopulation je nach Studie bei 25-40 %. Die Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv nach primärer Resektion zu entwickeln, liegt bei 70-80 % (McAuliffe et al. 2015).

Die Standardtherapie irresektabler KRLM besteht aus einer intensivierten systemischen Chemotherapie nach dem FOLFOX (Folinsäure, 5-Fluorouracil (5-FU), Oxaliplatin)- oder FOLFIRI-Schema (Folinsäure, 5-FU, Irinotecan). In den letzten Jahren wurden die Standardtherapieschemata für ausgewählte Patienten zunehmend durch die gezielte Krebsimmuntherapie mit Antikörpern gegen den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Bevacizumab, und gegen den *epidermal growth factor receptor* (EGFR), Cetuximab, ergänzt. Das Therapieziel hierbei besteht in einer Remissionsinduktion sowie einer dann gegebenenfalls möglichen kurativen sekundären Resektion der Metastasen mit einer Verlängerung der Lebenszeit (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014). Die Ansprechrate (*response rate*, RR) nach einer Firstline-Therapie liegt bei 60 % bei einem medianen Überleben von 24 Monaten, während das Therapieergebnis nach einer Secondline-Therapie deutlich schlechter ist (RR: 20-30 %, Medianes Überleben: 12 Monate) (Dhir et al. 2017).

1.1.2 Lebensqualität unter Chemotherapie

Wie oben beschrieben, konnte das mediane Überleben der Patienten mit irresektablen KRLM durch moderne Therapieschemata verbessert werden (Dhir et al. 2017). Allerdings geht die intensivierte und verlängerte Therapie mit zum Teil erheblichen Nebenwirkungen für die Patienten einher. Eine besonders wichtige Rolle spielt das Nebenwirkungsprofil hinsichtlich des Wohlbefindens der Patienten im chronifizierten Krankheitsverlauf nach einer Chemotherapie (Stefansson und Nygren 2016; Drott et al. 2016).

So führt die systemische Applikation von Irinotecan trotz entsprechender Begleitmedikamente zu gastrointestinalen Symptomen, wie z. B. Diarrhoe bei 63,5 % oder Übelkeit und Erbrechen bei 72 % der Patienten. Hinzu kommen Alopezie (42 %) und die hämatologische Toxizität (ca. 30 %) (Colucci et al. 2005).

Daher ist die Verringerung von Nebenwirkungen neben dem Verlängern des Überlebens ein wichtiges Ziel neuer Therapieansätze. Um eine Chronifizierung des Krankheitsverlaufs bei irresektablen KRLM zu erzielen und somit sowohl das mediane Überleben als auch die Lebensqualität der Patienten unter Therapie zu steigern, gewinnt die lokoregionäre Therapie durch hepatoarterielle Infusion und transarterielle Chemoembolisation zunehmend an Bedeutung in der klinischen Anwendung und Forschung (Groot Koerkamp et al. 2017; Fiorentini et al. 2012; Dhir et al. 2017).

1.2 Lokoregionäre Therapie

1.2.1 Hepatoarterielle Infusion

Die hepatoarterielle Infusion (HAI) ist ein chirurgisches Verfahren zur gezielten lokalen Applikation von Chemotherapeutika in die Leber mittels eines perkutanen Pumpsystems (Memorial Sloan Kettering Cancer Center Zugriff: 15.07.2017).

Nach einem rechtsseitigen, subkostalen Schnitt von der Linea alba zur Linea axillaris anterior dextra wird die Leber auf mögliche Pathologien untersucht und eine Cholezystektomie durchgeführt. Anschließend werden die *Arteria gastroduodenalis* und die *Arteria hepatica* freigelegt. Der Katheter für die HAI wird in die *Arteria gastroduodenalis* nahe dem Übergang zur *Arteria hepatica* platziert. Um eine Malperfusion des Magens sowie die Disposition des Magens, des Darms und des Pankreas mit Chemotherapeutikum zu verhindern, erfolgt die dauerhafte Ligatur der *Arteria gastrica dextra* und der *Arteria gastroduodenalis* distal der Inzisionsstelle des Katheters. Anschließend müssen die Perfusion der Leber und die korrekte Lage des Katheters nuklearmedizinisch geprüft werden. Die Pumpe wird durch einen zweiten Schnitt in einer subkutanen Hauttasche fixiert und an den Katheter angeschlossen. Die Lage ermöglicht die perkutane Beladung der inneren Kammer mit Chemotherapeutika sowie die Palpation der korrekten Lage der Pumpe (Curley et al. 1990; Kemeny et al. 1999). Für die langfristig kontinuierliche Applikation von Chemotherapeutika wurde ein perkutanes Pumpsystem mit Reservoir entwickelt (Blackshear et al. 1972).

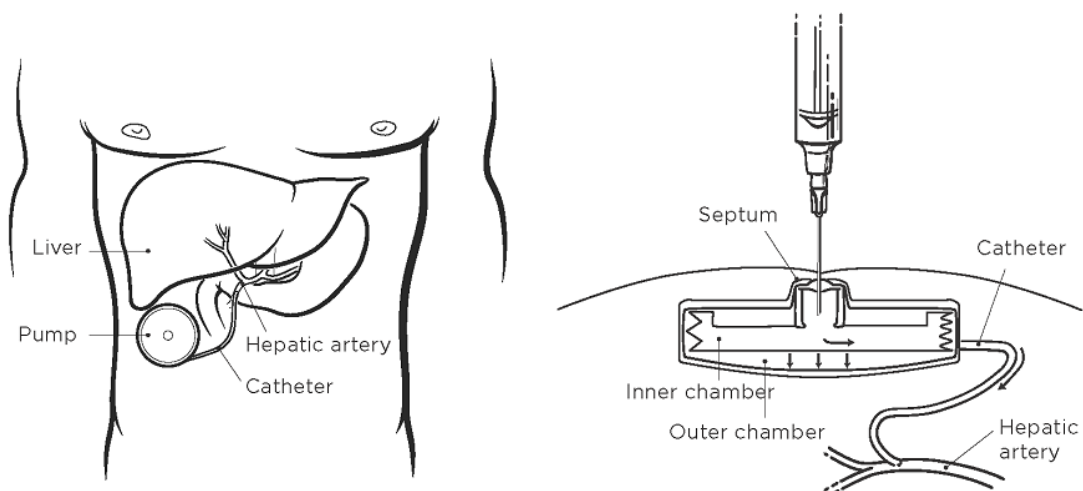


Abbildung 1: Platzierung und Auffüllung des perkutanen, hepatoarteriellen Pumpsystems. Mit freundlicher Genehmigung des Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York *liver* = Leber, *Hepatic artery* = *Arteria hepatica*, *Catheter* = Katheter, *Pump* = Pumpe, *Inner chamber* = Innenkammer, *Outer chamber* = Außenkammer.

Die HAI wurde bereits in den 1960er Jahren von Sullivan et al. (1964) für verschiedene Tumorentitäten in der palliativen Situation beschrieben. Die erste Studie an Patienten zeigte einen klinischen Benefit in Bezug auf eine Tumorreduktion (Sullivan et al. 1964).

Dieser beruht darauf, dass die HAI zu höheren lokoregionären Konzentrationen der Chemotherapeutika führt. Während KRLM ausschließlich von der *Arteria hepatica* perfundiert werden, wird das gesunde Lebergewebe hauptsächlich durch die *Vena portae hepatis* versorgt (Breedis und Young 1954; Cercek et al. 2016). Dadurch kann eine höhere lokale Wirksamkeit bei gleichzeitig geringeren systemischen Nebenwirkungen erzielt werden (Cercek et al. 2016).

Dieser Effekt wird durch die Verwendung von Chemotherapeutika mit hoher Leberextraktion, wie z. B. FUDR, verstärkt (Ensminger et al. 1978). Die hohe Leberextraktion bestimmter Medikamente wird durch den *First-Pass*-Effekt verursacht. Dieser beschreibt die Inaktivierung von bestimmten Medikamenten während der ersten Passage durch die Leber (Collins 1984). Daher lag der Fokus der Studien anfänglich auf der HAI mit FUDR (Ensminger et al. 1978).

Jedoch führte insbesondere die Kombination aus der FUDR-HAI mit einer systemischen Chemotherapie zu einer signifikant verbesserten RR (76 %) und somit zu einem verlängerten Überleben von bis zu 38 Monaten (D'Angelica et al. 2015). Fast die Hälfte der Patienten einer Phase-III-Studie konnte eine sekundäre Resektion der KRLM erhalten und somit in kurativer Intention behandelt werden (D'Angelica et al. 2015). In einem Langzeit-Follow-up über 21 Jahre konnte für Patienten, die eine Kombination aus HAI und systemischer Chemotherapie erhielten, im Gegensatz zu Patienten, die nur eine systemische Chemotherapie bekamen, ein signifikant verlängertes medianes Überleben nachgewiesen werden (67 gegen 44 Monate, $p < 0,001$, *Hazard Ratio* 0,67) (Groot Koerkamp et al. 2017).

In Europa rückten in den letzten Jahren Chemotherapeutika mit geringerer Leberextraktion, wie beispielsweise Oxaliplatin, in den Fokus, da FUDR zwar in den USA, nicht aber in Europa zugelassen ist. Unter der HAI mit Oxaliplatin in Kombination mit systemischer Chemotherapie konnten vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf das mediane Überleben und RR erzielt werden, das progressionsfreie Überleben zeigte sich mit 27 Monaten sogar verlängert im Vergleich zu 13 Monaten nach FUDR-HAI mit systemischer Chemotherapie (Ducreux et al. 2005; D'Angelica et al. 2015).

Die HAI in Kombination mit den modernen monoklonalen Antikörpern Bevacizumab und Cetuximab wurde bereits in präklinischen Studien am Rattenmodell getestet. Es zeigten sich insbesondere unter HAI von Cetuximab zusammen mit Bevacizumab und Oxaliplatin vielversprechende Ergebnisse in Hinblick auf die Reduktion der Tumorgöße (Sperling et al. 2013).

1.2.2 Transarterielle Chemoembolisation

Die transarterielle Chemoembolisation (TACE) ist ein interventionell-radiologisches Verfahren. Mittels Seldinger-Technik wird ein Katheter in die *Arteria femoralis* eingeführt und bis zur *Arteria hepatica* vorgeschoben. Zur Identifikation der tumorversorgenden Arterie wird eine digitale Subtraktionsangiographie mit Kontrastmittel durchgeführt. In diese wird anschließend ein Selektivkatheter platziert, um das Gemisch aus Embolisatpartikeln und Chemotherapie gezielt in das Tumorgewebe zu applizieren (Iwamoto et al. 2003). Durch die Selektivität dieser Methode wird das gesunde Lebergewebe weitestgehend geschont (Ji et al. 2008).

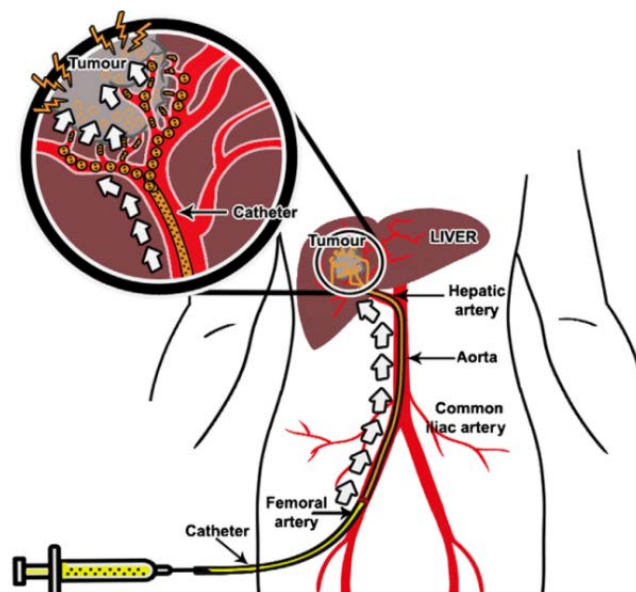


Abbildung 2: Transarterielle Chemoembolisation. Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags (Idée und Guiu 2013). *Tumour* = Tumor, *Catheter* = Katheter, *Liver* = Leber, *Hepatic artery* = *Arteria hepatica*, *Common iliac artery* = *Arteria iliaca communis*, *Femoral artery* = *Arteria femoralis*.

Die applizierten Embolisatpartikel verursachen eine Reduktion des Blutflusses im Kapillarbett des Tumorgewebes, so dass das gleichzeitig oder kurz danach injizierte Chemotherapeutikum langsamer abfließt und somit eine höhere lokale Konzentration sowie eine höhere örtliche Toxizität erreicht werden kann (Fiorentini et al. 2012). Demzufolge werden die Toxizität in der Peripherie verringert und somit die systemischen Nebenwirkungen minimiert (Martin et al. 2011; Fiorentini et al. 2012). Auch führen Embolisatpartikel zur Hypoxie und Nährstoffunterversorgung des angrenzenden Tumorgewebes und induzieren somit eine Nekrose (Wáng et al. 2015). Dadurch addieren sich der zytotoxische und der ischämische Effekt im Tumorgewebe (S3-Leitlinie Hepatozelluläres Karzinom 2013).

Man unterscheidet die Embolisatpartikel nach ihrer Größe und Beschaffenheit sowie nach ihrer Beladbarkeit mit Chemotherapeutika (Fiorentini et al. 2012; Martin et al. 2011). Durch beladbare Embolisatpartikel (*drug-eluting beads*, DEB) wird das Chemotherapeutikum erst nach Verschluss der Arterie kontrolliert freigesetzt. Außerdem werden die tumorversorgenden Gefäße permanent verschlossen (Eyol et al. 2008). Durch abbaubare Stärkepartikel (*degradable starch microspheres*, DSM) wird dagegen nur ein transienter Verschluss der Arteriolen von 15-30 Minuten herbeigeführt, da die Stärkepartikel durch die Serumamylase rasch abgebaut werden (Saenger et al. 2004).

Die TACE wird bereits seit Jahren als Standardtherapie des hepatozellulären Karzinoms (HCC) eingesetzt (Richardson et al. 2013). Nach der S3-Leitlinie Hepatozelluläres Karzinom (2013) ist die TACE eine Therapieoption bei Patienten in der palliativen Situation ohne extrahepatische Manifestation des Tumors. Dadurch wird ein Überlebensgewinn von 6-10 Monaten gegenüber der supportiven Therapie erzielt. Es werden hauptsächlich Embolisate zur permanenten Okklusion der tumorversorgenden Gefäße in Kombination mit Anthrazyklinen, Cisplatin oder Mitomycin C verwendet, um einen möglichst großen Grad an Nekrose zu erzeugen. Beladbare Partikel werden vornehmlich benutzt, wenn die systemische und hepatische Toxizität der Chemotherapie minimiert werden soll (S3-Leitlinie Hepatozelluläres Karzinom 2013).

Die Verwendung der TACE bei Patienten mit KRLM ist bisher an klinische Studien gebunden. Bei vorbehandelten Patienten konnte bereits ein signifikanter Vorteil der TACE mit DEB und Irinotecan in Bezug auf das mediane Überleben gegenüber der systemischen FOLFIRI-Therapie nachgewiesen werden. Zusätzlich war durch die TACE mit DEB und Irinotecan die Lebensqualität deutlich verbessert (Fiorentini et al. 2012).

Im Rattenmodell ist die TACE über die *Arteria femoralis* aufgrund des Größenverhältnisses nicht möglich. Daher werden die Embolisatpartikel und das Chemotherapeutikum via *Arteria gastroduodenalis* appliziert. Die oben im Menschen beschriebenen Effekte sind hingegen entsprechend auch in Ratten zu beobachten (Kamphorst et al. 1999; Bödeker et al. 2003).

1.3 Zytostatika

1.3.1 Irinotecan

Irinotecan (CPT-11) ist ein Derivat des pflanzlichen Wirkstoffs Camptothecin. Es hemmt die Topoisomerase I, die während der *Desoxyribonucleinacid* (DNA)-Replikation zu Einzelstrangbrüchen führt, um die Torsionsspannung zu minimieren. Durch Binden des Prodrugs CPT-11 und vor allem dessen aktivem Metaboliten 7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin (SN-38) an die Topoisomerase I und an die DNA kommt es zu dauerhaften Doppelstrangbrüchen. Der menschliche Körper hat für solche Schäden nur eingeschränkte Reparaturmechanismen, so dass es zum Abbruch der Replikation und zum Untergang der Zelle kommt. Da Irinotecan in der S-Phase des Zellzyklus angreift, wirkt es nur auf proliferierende Zellen (Mathijssen et al. 2001).

1.3.1.1 Humaner Metabolismus

Durch die Carboxylesterase der Leber wird CPT-11 in seine aktive Form SN-38 überführt. Dieses hat eine 100- bis 1000-fach höhere Zytotoxizität als CPT-11. Letzteres besitzt einen α -Hydroxyl- δ -Lacton-Ring, welcher pH-abhängig reversibel zu Hydroxylcarboxylat hydrolysiert. Für die pharmakologische Wirkung ist allerdings hauptsächlich die Lactonform verantwortlich. Ein Gleichgewicht stellt sich relativ schnell zugunsten der Carboxylatform ein. Im Gegensatz dazu ist bei dem Metaboliten SN-38 das Verhältnis 30-60:40-70 zugunsten des Entstehens der Lactonform. Günstig ist ebenfalls, dass das Tumorgewebe meist einen saureren pH-Wert aufweist und dadurch eine höhere Gewebekonzentration der Lactonform vorliegt (Mathijssen et al. 2001; Xie et al. 2002).

Neben der Carboxylesterase wird CPT-11 auch durch das Enzym Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) im Blut zum inaktiven 7-Ethyl-10-[4-N-(5-Aminopentanoic acid)-1-Piperidino]-Carboxyloxycamptothecin (APC) und in der Leber zum inaktiven 7-Ethyl-10-[4-(1-Piperidino)-1-amino]-Carboxyloxycamptothecin (NPC) abgebaut. Durch die Glucuronosyltransferase UGT1A1/7 wird SN-38 zum inaktiven SN-38-Glucuronid abgebaut und ausgeschieden (Mathijssen et al. 2001; Xie et al. 2002).

In kolorektalem Tumorgewebe besteht ein anderer Metabolismus des CPT-11 als in normalem Lebergewebe. In gesunden Hepatozyten findet vorrangig die Umwandlung zu inaktiven NPC statt, so dass nur ein geringer Anteil des CPT-11 in den aktiven Metaboliten SN-38 umgewandelt wird. In kolorektalen Karzinomzellen dagegen wird kein CYP3A4 und kein UGT1A1/7 exprimiert, so dass ein höherer Anteil an CPT-11 in SN-38 umgewandelt werden kann. Zusätzlich wird durch den Blutfluss SN-38 aus den Leberzellen zum Tumor transportiert. Allerdings besitzt das gesunde Kolongewebe ebenso wie das Gewebe im Ileum und Jejunum eine hohe Aktivität der Carboxylesterase. Da auch diese Gewebe hochproliferativ sind, kommt es hier zu einer Interaktion zwischen CPT-11/SN-38 und der

Topoisomerase I. Die Folge sind massive Durchfälle als Nebenwirkung der Therapie (Guichard et al. 1999).

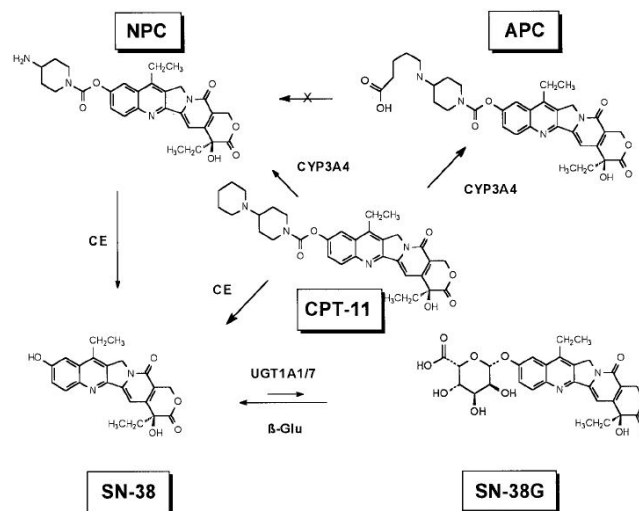


Abbildung 3: Metabolismus von Irinotecan. Mit freundlicher Genehmigung der *American Association for Cancer Research* (Mathijssen et al. 2001). CE = Carboxylesterase.

1.3.1.2 Metabolismus in der Ratte

Der Metabolismus von CPT-11 in der Ratte weist entscheidende Unterschiede im Vergleich zum humanen Metabolismus auf. In der Ratte wird das Enzym CYP3A4 nicht exprimiert, so dass der Abbau von CPT-11 zu APC und NPC fehlt. Es wird daher ein größerer Anteil an CPT-11 zum aktiven Metaboliten SN-38 umgebaut (Martignoni et al. 2006).

1.3.2 Nanoliposomales Irinotecan

Nanoliposomales Irinotecan (Onivyde®) gehört zu den nanoliposomalen Medikamententransportsystemen und wurde durch Drummond et al. (2006) etabliert. Die nanoliposomalen Partikel bestehen aus einer Lipiddoppelschichtkapsel, das sog. Liposom, und einem Kern aus stark negativ geladenem Sucrosulfat-Salz. Dieses bildet mit dem positiv geladenen Irinotecan einen Komplex, so dass anhand des elektrochemischen Konzentrationsgefälles das Liposom mit bis zu 800g CPT-11/mol Phospholipid beladen werden kann. Außerdem wird CPT-11 durch die Komplexbildung in der aktiven Lactonform stabilisiert und vor vorzeitigem Abbau und Metabolismus geschützt (Drummond et al. 2006).

Liposom-ummantelte Medikamente unterliegen dem sog. *enhanced-permeability-and-retention-effect* (erhöhte-Permeabilität-und-Retention-Effekt, EPR-Effekt). Dieser beschreibt, dass das Endothel im Tumorgewebe durch Neoangiogenese fenestriert und dadurch besonders durchlässig für Makromoleküle und Liposome ist. Auch wird durch den fehlenden

Lymphabfluss des Tumors der Abtransport verlangsamt. Dadurch kommt es zur Akkumulation des nanoliposomalen Irinotecans im Tumorgewebe. Zusätzlich kann es vom gesunden Gewebe schlechter aufgenommen werden (Matsumura und Maeda 1986).

Durch die Komplexbildung wird CPT-11 langsamer abgegeben und deutlich langsamer abgebaut. Daher zirkuliert es länger im Kreislauf als freies CPT-11. Dies resultiert in einer erhöhten Bioverfügbarkeit (Drummond et al. 2006; Kalra et al. 2014).

1.4 Embolisatpartikel

1.4.1 EmboCept® S

EmboCept® S sind auflösbare, dreidimensionale, vernetzte, hydrophile Stärkepartikel (*degradable starch microsphere*, DSM) mit einer durchschnittlichen Größe von 50 µm. Die Zytostatika werden kurz vor der Applikation mit der EmboCept® S-Lösung vermischt. Dabei erfolgt keine Beladung der Partikel und somit können diverse Zytostatika verwendet werden. Es kommt zu einem transienten Verschluss der tumorversorgenden Arterie, da die Partikel durch die Serum-Amylase vollständig abgebaut werden. Die Halbwertszeit der Partikel beträgt dabei im Mittel 35 Minuten (PharmaCept Zugriff: 18.04.2017). Durch die kurzzeitige Okklusion kommt es zu einer erhöhten Aufnahme des Chemotherapeutikums ins umliegende Tumorgewebe, so dass die systemische Konzentration des Chemotherapeutikums sinkt (Starkhammar und Håkansson 1987; Lindell et al. 1978). Dadurch können auch Medikamente ohne signifikanten First-Pass-Effekt verwendet werden (Saenger et al. 2004).

1.4.2 Tandem™ 40 µm

Tandem™ 40 µm wurde 2012 durch CeloNova® BioSciences, Inc. entwickelt (Tanaka et al. 2014). Es ist ein DEB und kann sowohl mit Irinotecan (indiziert bei KRLM) als auch mit Doxorubicin (indiziert bei HCC) beladen werden (Blümmel et al. 2012). Die Partikel bestehen aus einer biokompatiblen Polyzene™-F-Hülle und einem negativ geladenen Kern aus einem Polymethylmethacrylat-Hydrogel. Die Beladung erfolgt reversibel durch elektrostatische Anziehungskräfte zwischen dem positiv geladenen Chemotherapeutikum und dem Polymethylmethacrylat (Gnutzmann et al. 2015). Die Freisetzung erfolgt durch Diffusion des Chemotherapeutikums. Tandem™ 40 µm sind die kleinsten verfügbaren Embolisate auf dem Markt. Daher kann es die kleinsten Äste der tumorversorgenden Arterien permanent verschließen. Auch wird durch die langsame und konstante Freisetzung die maximale Plasmakonzentration länger aufrechterhalten. Durch die gezielte Abgabe des geladenen Chemotherapeutikums im Tumorgewebe über einen längeren Zeitraum, können längerfristig höhere lokoregionäre Konzentrationen erreicht werden (Tanaka et al. 2014).

1.5 Klinische Einordnung

Lokoregionäre Therapien sind seit Jahren Bestandteil der Therapie lebereigener Tumoren (S3- Leitlinie hepatozelluläres Karzinom 2013). Demgegenüber werden diese Verfahren bei Patienten mit KRLM in Europa nur zögerlich eingesetzt, obwohl in Studien deren Überlegenheit gegenüber der alleinigen systemischen Therapie besonders als Salvage-Therapie nach Progredienz unter First-/Secondline-Therapie nachgewiesen wurde. Auch präklinische Studien im Tiermodell zeigen vielversprechende Ergebnisse (Saenger et al. 2004; Eyol et al. 2008; Sperling et al. 2013).

Alle in dem vorliegenden Projekt verwendeten Substanzen sind bereits zum Einsatz am Menschen zugelassen. Allerdings ist der genaue Wirkmechanismus beladbarer und unbeladbarer Embolisatpartikel auf molekularer Ebene nicht untersucht. Durch den Einsatz klinisch zugelassener Präparate erklärt sich der direkte translationale Ansatz dieser Arbeit.

1.6 Ziel der Studie

Ziel der Studie ist es, den Effekt einer hepatoarteriellen Infusion in einem KRLM-Modell in WAG/Rij-Ratten zu untersuchen. Hierzu werden die Embolisatpartikel Tandem™ 40 µm und EmboCept® S sowie die Chemotherapeutika Irinotecan und Onivyde® verwendet. Besonderes Augenmerk gilt der Differenzierung von DNA- und Hypoxie-induzierten Schäden. Dazu wurde die vorliegende Arbeit in drei Versuchsabschnitte gegliedert. Im ersten Versuchsabschnitt wurde die molekulare Wirkung von Irinotecan *in vitro* untersucht. Der zweite Versuchsabschnitt analysiert die molekularen Veränderungen im KRLM-Gewebe bereits vier Stunden nach der Behandlung und vergleicht diese mit den nachgewiesenen CPT-11- und SN-38-Konzentrationen im Plasma, Tumor- und Lebergewebe. Im letzten Versuchsabschnitt werden die molekularen Veränderungen 72 Stunden nach der Behandlung sowie das Tumoransprechen bestimmt.

Es wird insbesondere auf folgende Fragestellungen eingegangen:

- Zeigen kolorektale Adenokarzinomzellen der Ratte unter Behandlung mit Irinotecan *in vitro* nachweisbare molekulare Veränderungen?
- Zeigt die zusätzliche Verwendung von Embolisatpartikeln im Vergleich zur alleinigen HAI mit Chemotherapie einen größeren Effekt auf die Proliferations-, Angiogenese- und Apoptoserate des Tumors?
- Verursacht der Einsatz von Embolisatpartikeln eine auf molekularer Ebene nachweisbare Hypoxie?
- Kann zwischen Embolisatpartikel-verursachten Hypoxie- und Chemotherapie-induzierten DNA-Schäden differenziert werden?
- Korrelieren vier Stunden nach der Behandlung die molekularen Veränderungen mit den nachgewiesenen CPT-11- und SN-38-Konzentrationen im Tumorgewebe?
- Welche Veränderungen lassen sich im gesunden Lebergewebe auf molekularer Ebene unter den verschiedenen Therapieformen 72 Stunden nach der Behandlung finden?

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

4-0 PDS™ II	Ethicon, Johnson& Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
4-0 Perma-Hand Seide	Ethicon, Johnson& Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
7-0 Coated Vicryl	Ethicon, Johnson& Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
Adhäsive Objektträger Starfrost	Engelbrecht Medizin & Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
<i>Amersham™ Hybond™ PVDF Blotting Membran</i>	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, United Kingdom
Auslaufpipetten, serologisch	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Dreiwegehahn Discifix	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Durapore™ 2,5cm	3M Deutschland GmbH, St. Paul, USA
Filterpapier, <i>Chromatography Paper</i> 3mm Chr.	Whatman™ GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, United Kingdom
Katheter, <i>Fine Bore Polythene Tubing</i> 0,96mm	Smiths Medical International Ltd., Hythe, United Kingdom
Kompressen 5x5cm	NOBA Verbandmittel Danz AG, Wetter, Deutschland
Kryoröhrchen 1,2ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Mikrotomklingen Feather	Pfm, Köln, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen, Tip One®	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, Tip One®, steril	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Platten, 96-Well, Cyto One®	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Reaktionsgefäße (2 ml)	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Röhrchen, Falcon Tube (15 und 50ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Spritze BD Plastipak 1 ml	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Sterican 27 G Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Wattestäbchen	NOBAMED Paul Danz AG, Wetter, Deutschland
Zellkulturflaschen Cyto One® (25, 75 und 225 cm ²)	STARLAB GmbH, Hamburg Deutschland
Zellschaber, 300 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.2 Chemikalien

Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Brilliant Blau R250 Tabletten	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau-Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dodecylsulfat Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100 % Ph. Eur., reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99 %	Chemie Vertrieb, Hannover, Deutschland
Ethanol, ROTIPURAN® ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,5 M, pH = 8,0	Quality Biological Inc., Gaithersburg, MD, USA
Formalin 37 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glyzin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Luminata™ Forte, <i>Western horse raddish peroxidase (HRP) Substrate</i>	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Marker, <i>Magic Mark™ XP Western Standard</i>	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Marker, <i>Spectra™ Multicolour Broad Range Protein Ladder</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Methanol, ROTIPURAN® ≥99,9 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Milchpulver Blotting grade, fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natrium Deoxycholat $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl) $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH) Plättchen	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nonidet® P40 (NP40)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor Cocktail Tabletten, PhosSTOP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Protease-Inhibitor Cocktail, Protease Block™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Richard-Allan Scientific™ Hematoxylin 7211	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Rotiphorese® Gel30 Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Shandon™ Eosin Y	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vitro Cloud, Eindeckmittel	R. Langenbrinck Labor und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande

2.3 Geräte

<i>charge-coupled device</i> (CCD) Kamera, ImageQuant LAS 4000 mini	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Schweden
Färbeautomat BenchMark XT	Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC Professional	Vacuu Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Gelelektrophoresekammer, Minigel-Twin	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Glasplatte, ausgeschnitten, für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Glasplatte, fixe Spacer, 1,0 mm, für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Heizplatte	Klaus Effenberger, Pfaffing/Attel, Deutschland
Incubator C200, Inkubator CO2	Labotect GmbH, Göttingen, Deutschland
Kämme (10- und 16-zählig), für Minigele	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Leica EG 1160, Einbetter	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Leica TP 1020, Automatische Gewebeeinfiltration	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop Axio Imager	Carl Zeis MicroImaging GmbH, Deutschland
Mikroskop, invers, Leica DM IL	Leica AG, Wetzlar, Deutschland
Netzgerät, PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Netzgerät, Standard Power Pack HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany
Op-Lampe	Hanaulux, Heidelberg, Deutschland
Op-Mikroskop, WILD M650	Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz
Pipetten, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer, accu-jet®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Präzisionswaage, BP 610	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage, ED224S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Schlittenmikrotom Microm HM439	MICROM International, Walldorf, Deutschland
Semi-Dry Elektrobloetter	PEQLAB GmbH, Erlangen, Deutschland
Silikonabdichtung, 1,0 mm, für Minigel	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Sterilbank, Biowizard Xline	Kojair, Vilppula, Finnland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschallhomogenisator SONOPULS HD 3100	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vapor 2000, Arzneimittelverdampfer	Dräger, Lübeck, Deutschland
Vevo 2100 Imaging Plattform, Kleintierultraschalgerät	VisualSonics BV, Amsterdam, Niederlande
Vevo Imaging Station	VisualSonics BV, Amsterdam, Niederlande

Vevo MicroScan Transducer MS 400 30MHz, Ultraschallkopf	VisualSonics BV, Amsterdam, Niederlande
Victor™ Multilabel Plate Reader	PerkinElmer, Inc., Waltham, USA
Vortexer, RS VA 10	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Wärmeplatte	Medax & Nagel, Kiel, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Wasserbad, Isotemp Model 2333	Fisher Scientific Laboratory Equipment, Marietta, USA
Water Purification System, Milli-Q Reference Ultrapure	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Wippschüttler, WS42	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg/ Versbach, Deutschland
Zählkammer, Neubauer improved	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge C-12000, Mini	National Labnet CO, Woodbridge, USA
Zentrifuge, Allegra X30R	Beckman Coulter, Brea, USA
Zentrifuge, Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

2.4 Zelllinie

CC531	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland
-------	--

2.5 Zellkulturreagenzien

0,25 % Trypsin -EDTA	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetal Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamine 200 mM in 0,85 % NaCl Solution	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Nährmedium, RPMI-1640-Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphate-Buffered Saline (PBS), pH 7,2	Gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.6 Versuchstiere

WAG/Rij-Ratten	Charles River Deutschland, Keißlegg, Deutschland
----------------	--

2.7 Materialien zur Tierhaltung

ssniff SM R/M, 10mm-Pellets	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Tierkäfig, Modell Makrolon ® IV	

2.8 Medikamente

Carprieve, Caprofen 50 mg/ml Injektionslösung	Norbrook Laboratories Limited Station Works, Newry, United Kingdom
Cepetor 1 mg/ml	CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland
EmboCept® S 7,5 g/ml	PharmaCept GmbH, Berlin, Deutschland
Irinotecan Actavis 20 mg/ml	Puren Pharma GmbH & CO. KG, München, Deutschland
Ketamin 10 %	medistar Arzneimittelvertrieb GmbH, Ascheberg, Deutschland
NaCl 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Onivyde® 5 mg/ml	Baxalta Innovations GmbH, Wien, Österreich
SEVOrane, Sevofluran 100 %	AbbVie Deutschland GmbH & CO. KG, Ludwigshafen, Deutschland
Tandem™ 40 µm	CeloNova® BioSciences Germany GmbH, Ulm, Deutschland

2.9 Antikörper

2.9.1 Primärantikörper

Anti-Actin (A2066)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-gamma H2A.X (phospho S139) antibody (ab2893)	abcam plc, Cambridge, United Kingdom
Caspase-3 (8G10) Rabbit mAb #9665	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
CD31 Antibody, 250590	Abbiotec™, LLC, San Diego, USA

<i>cleaved</i> Caspase-3 (Asp175) (D3E9) Rabbit mAb #9579	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
HIF1A Antikörper (AP20633PU-N)	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
PCNA Monoclonal Antibody (PC10) (MA5-11358)	invitrogen GmbH, Carlsbad, USA

2.9.2 Sekundärantikörper

Mouse IgG (H+L chain) Antikörper (R1253HRP)	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
Rabbit IgG (H+L chain) Antikörper (R1364HRP)	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland

2.10 Puffer, Lösungen

Tris-buffered-saline-Puffer (TBS-Puffer)

Reagenzien	Endkonzentration
Tris	50 mM
NaCl	150 mM
zweifach destilliertes Wasser	
pH- Wert: 7,5	

Tris-buffered-saline + 0,1 % Tween® 20-Puffer (TBS-T-Puffer)

Reagenzien	Endkonzentration
TBS-Puffer	
Tween® 20	0,10 %

Radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-Puffer

Reagenzien	Endkonzentration
Tris	50 mM
NaCl	150 mM
Na-Deoxycholate	0,50 %
NP-40	1,00 %
EDTA	2 mM
zweifach destilliertes Wasser	100 ml

RIPA-Lysepuffer

RIPA-Puffer	
PhosStop	1:25
Proteaseinhibitor	1:10

SDS-PAGE-Sammelgelpuffer

Reagenzien	Endkonzentration
Tris ultrapure	1 M
zweifach destilliertes Wasser	
pH-Wert: 6,8	

SDS-PAGE-Trenngelpuffer

Reagenzien	Endkonzentration
Tris	1,5 M
zweifach destilliertes Wasser	
pH-Wert: 8,8	

SDS-PAGE-Laufpuffer

Reagenzien	Endkonzentration
Tris ultrapure	25 mM
Glyzin	192 mM
zweifach destilliertes Wasser	
pH-Wert: 8,3	

Western Blot-Transferpuffer

Reagenzien	Endkonzentration
Tris ultrapure	48 mM
Glyzin	39 mM
SDS-Lösung, 10 %	0,04 %
Methanol	20 %
zweifach destilliertes Wasser	

Blockierpuffer für Western Blot-Membran, Lösungspuffer für Antikörper (Milch-TBS-T)

Reagenzien	Endkonzentration
TBS-T-Puffer	100 ml
Milchpulver Blotting grade, Pulver, fettarm	5 %

Lösungspuffer für Antikörper

Reagenzien	Endkonzentration
TBS-T-Puffer	
Bovines Serum Albumin	5 %

Coomassie-Fixierlösung für Gele

Reagenzien	Endkonzentration
Methanol	50 %
Essigsäure	10 %
zweifach destilliertes Wasser	40 %

Coomassie-Färbelösung für Gele

Reagenzien	Endkonzentration
Methanol	50 %
Coomassie Brilliant Blue	0 %
Essigsäure	10 %
zweifach destilliertes Wasser	40 %

Coomassie-Entfärbelösung für Gele

Reagenzien	Endkonzentration
Methanol	5 %
Essigsäure	7 %
zweifach destilliertes Wasser	88 %

4 %-PBS-gepuffertes Formalin

Reagenzien	
Formalin 37 %	54 ml
PBS	446 ml

RPMI-Einfriermedium

RPMI-Kulturmedium	
FBS	20 %
Glutamin	1 %
Dimethylsulfoxid	10 %

2.11 Kits

Pierce® Bicinchoninic Acid Assay (BCA) Protein Assay Kit:	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
BCA Reagent A	
BCA Reagent B	
Albumin Standard Ampullen, 2 mg/ml	

Substanzen für den Färbeautomat BenchMark XT:	Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA
EZ Prep	
LCS	
Reaktion Buffer	
CC1 (Cell Conditioner)	
Antibody Diluent	
Ahämatoxillin II	
Bluing Reagent	

ultraView Univeral DAB Detection Kit:	Ventana Medical Systems, Mannheim, Deutschland
Inhibitor	
Multimer Ig	
DAB	
H ₂ O ₂	
Copper	

2.12 Software

Grapher™ 8	Golden Software Inc., Golden, CO, USA
Zotero	Roy Rosenzweig Center for History and New Media, Georg Mason University, Washington DC, USA
Microsoft Office 2016 (Word, Excel, Power Point)	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
STATISTICA 13	StatSoft®, Hamburg, Deutschland

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Es wurden syngene kolorektale Adenokarzinomzellen der CC531-Zelllinie verwendet. Diese Zellen wurden in den 1980er Jahren aus kolorektalen Adenokarzinomen gewonnen, welche durch 1,2-Dimethylhydrazin in WAG/Rij-Ratten induziert wurden (Thomas et al. 1993; Marquet et al. 1984).

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Anteil bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Sämtliche Arbeiten mit der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank durchgeführt.

Das Nährmedium RPMI wurde mit 10 % fetalem bovinem Serum (FBS) und 1 % Glutamin versetzt. Vor der Verwendung wurde dieses sowie PBS und Trypsin auf 37 °C vorgewärmt.

3.1.1 Kultivierung und Passagieren der Zelle

Die Zellen wurden in RPMI-Einfriermedium in 1,2-ml-Kyrogefäßen bei -150 °C konserviert. Zur Kultivierung wurden sie in 10 ml RPMI-Medium aufgetaut und in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 800*g wurde das Einfriermedium abgesaugt, das Pellet in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert, in eine T25er Kulturflasche überführt und im Brutschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte die Passagierung in eine größere Kulturflasche. Dazu wurde das Nährmedium mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden diese mit 0,5 ml Trypsin im Brutschrank für ca. 10 min inkubiert bis sich die zuvor adhärenen Zellen vom Flaschenboden ablösten. Diese Reaktion wurde mit 10 ml RPMI-Medium abgestoppt. Die entstandene Suspension wurde für 5 min bei 800*g zentrifugiert. Nach Absaugen des überstehenden Mediums und Resuspension des Zellpellets mit 10 ml RPMI-Medium wurde die Zelllösung in eine T75er Kulturflasche überführt und im Brutschrank aufbewahrt. Danach befanden sich die Zellen für mindestens 72 h in Kultur bevor sie für Experimente bzw. die Tumorimplantation verwendet wurden.

Zur Vermehrung wurden die Zellen alle zwei Tage bei einer Konfluenz von 70-80 % gesplittet. Dafür wurde 1 ml der Zellsuspension in eine T75er Flasche überführt und mit Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt.

3.1.2 Zellzahlbestimmung

Bei einer Konfluenz von 60-70 % (in Passage 2 für die Tumorimplantation; in Passage 4-8 für die *in-vitro*-Experimente) wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin im Brutschrank für 10 min inkubiert. Anschließend wurden sie mit 10ml RPMI-Medium in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen übertragen und für 5 min bei 800*g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des überstehenden Mediums und der Resuspension des Zellpellets mit 10 ml RPMI-Medium wurden 100 µl der Zellsuspension mit 900 µl Typhanblau angesetzt, um geschädigte Zellen anzufärben. 10 µl dieser Suspension wurden pro Kammerfenster in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl mit Hilfe des inversen Lichtmikroskops bei einer 100-facher Gesamtvergrößerung bestimmt. Es wurde das arithmetische Mittel der acht Zählfelder gebildet und mit dem Faktor 10^5 auf die Zellzahl pro Milliliter hochgerechnet (Brand GmbH + Co KG).

3.2 Versuchsabschnitt I: *In-vitro*-Versuche

3.2.1 *In-vitro*-Behandlung der Zellen mit Irinotecan

Für die *in-vitro*-Behandlung der Zellen mit Irinotecan wurden nach dem Auszählen der Zellen zweimal 0,5 Mio. Zellen (Kontrollgruppen) und dreimal 1,5 Mio. Zellen (Experimentalgruppen) in je eine T25er Kulturflasche angesetzt und mit Nährmedium auf 5 ml aufgefüllt.

Am folgenden Tag wurden die Zellen der Experimentalgruppen mit 25 μM , 40 μM oder 80 μM Irinotecan behandelt. Bei den Flaschen der Kontrollgruppen erfolgte ein Mediumwechsel. Als Positivkontrolle des Antikörpers gegen CASPASE-3 wurde eine Kontrollgruppenflasche mit 1 μM Staurosporin für 12 h behandelt.

3.2.2 Proteinisolation

Nach 72-stündiger Inkubation der Experimentalgruppen erfolgte die Proteingewinnung. Der Überstand der Kulturflaschen wurde in je ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 800*g wurden die Zellreste mit 5 ml PBS gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden zunächst in 5 ml PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden sie durch Zugabe von 300-1000 μl RIPA-Lysepuffer und mechanisches Abkratzen mit dem Zellkulturschaber direkt im Zellkulturgefäß lysiert. Das gewonnene Lysat wurde in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Die Zellreste aus dem Überstand wurden ebenfalls mit RIPA-Lysepuffer behandelt und in das Reaktionsgefäß des entsprechenden Zellysats überführt. Anschließend erfolgte eine mechanische Zellyse mit Hilfe eines Ultraschallhomogenisators. Die Membran- und Zellreste wurden durch Zentrifugieren bei 4 °C mit 10*g für 10 min abgetrennt. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die Proteinproben bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung konserviert. Das Pellet wurde verworfen.

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurde ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA-*Assay*) durchgeführt. Im alkalischen Milieu reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^+ (Biuret-Reaktion), welches eine bläuliche Farbreaktion zeigt. Zur Steigerung der Sensivität bildet BCA mit Cu^+ einen violetten Komplex. Dieser zeigt bei 562 nm ein Absorptionsmaximum, welches proportional zum Proteingehalt der Probe ist (Smith et al. 1985).

Es wurden Triplikate einer Standardkurve von je 25 μl mit definierten Konzentrationen einer Lösung mit bovinem Serumalbumin (BSA) sowie Triplikate mit einer 1:25 Verdünnung der zu messenden Proben auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend

wurden ihnen 200 µl eines BCA-Reagenz zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte die photometrische Messung der Extinktion der jeweiligen Proben bei 544 nm mit Hilfe des Victor™ Multilabel Plate Readers.

Durch die ermittelten Extinktionswerte der Standardkurve mit bekannter Proteinkonzentration konnte eine Steigung errechnet werden. Diese wurde zur Berechnung der Konzentration der Proteinproben verwendet. Durch die Verwendung von Triplikaten sowohl der Standardkurve als auch der zu ermittelnden Proteinproben konnten Mess- und Pipettierfehler minimiert werden. Durch das Bestimmen der genauen Proteinkonzentration der Proben konnte eine definierte Proteinmasse von 20 µg pro Probe auf das Elektrophoresegel aufgetragen werden.

3.2.4 Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen. Dazu wird das Proteingemisch mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) aufgetrennt. SDS führt dazu, dass alle Proteine die gleiche Ladung haben und nur nach ihrem molekularen Gewicht im elektrischen Feld sortiert werden. Die Laufstrecke der Proteine auf dem Gel ist abhängig von der Porengröße des Gels. Anschließend werden die Proteinbanden mittels senkrecht anliegenden Stroms auf eine Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen (Burnette 1981). Der Nachweis des zu untersuchenden Proteins basiert auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Dazu wird auf die Membran mit den Proteinen ein spezifischer Primärantikörper aufgetragen. Durch einen Sekundärantikörper, der gegen den konstanten Teil des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Detektionssystem konjugiert ist, kommt es zu Signalamplifikation. Das Detektionssystem ist meist das Enzym Peroxidase. Durch das Auftragen des spezifischen Chromogens kann das gesuchte Protein nachgewiesen werden (Netzker 2012; Goldman und Speicher 2015).

3.2.4.1 SDS-PAGE

Die Proben wurden mit einem SDS-haltigen Ladepuffer im Verhältnis 1:5 versetzt und anschließend bei 95 °C für 5 min erhitzt. Für das Auftrennen von Proteinen von einer Größe zwischen 15-30 kDa wurde ein 15 %-Trenngel, für größere Proteine wurde ein 10 %-Trenngel (s. Tabelle 2) verwendet.

Tabelle 2: Zusammensetzung für 3 Minigele bestehend aus Trenn- und Sammelgel

Reagenzien	10 %-Trenngel	15 %-Trenngel	5 %-Sammelgel
Zweifach-distilliertes Wasser	7,9 ml	4,6 ml	6,8 ml
30 % Rotiphorese	6,7 ml	10 ml	1,7 ml
Trenngelpuffer	5 ml	5 ml	
Sammelgelpuffer			1,25 ml
10 % SDS Lösung	200 µl	200 µl	100 µl
10 % APS Lösung	200 µl	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	20 µl	10 µl
Bromphenol-Blue			75 µl

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingeklemmt, die mit SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Nach Spülen der Gelkammern mit SDS-Laufpuffer wurden je 20 µg Proteine in diese pipettiert. Zur Größeneinordnung des molekularen Gewichts wurden ebenfalls 2 µl *Spectra™ Multicolour Broad Range Protein Ladder Marker* und 1 µl *Magic Mark™ XP Western Standard Marker* aufgetragen. Zum Konzentrieren der Proben im 5 %-Sammelgel wurde eine Stromstärke von konstant 20 mA pro Gel für ca. 30 min angelegt. Danach wurde die Stromstärke auf 30 mA gesteigert, um die Proteine zu trennen. Der Elektrophoreseprozess wurde beendet, sobald die durch den blauen Ladepuffer gekennzeichnete Lauffront an der Unterkante des Gels herauslief. Nach kompletter Auftrennung der Proteine konnte der Western Blot erfolgen.

3.2.4.2 Western Blot

Als Trägermembran für den Western Blot diente eine PVDF-Membran, welche in Methanol aktiviert wurde. Nach 3-minütigen Waschen in zweifach destilliertem Wasser wurden die Membran, das Gel sowie zweimal drei Filterpapierstücke in Transferpuffer für 15 min inkubiert. Es wurde das *semi-dry* Verfahren angewendet. Der Aufbau ist wie folgt:

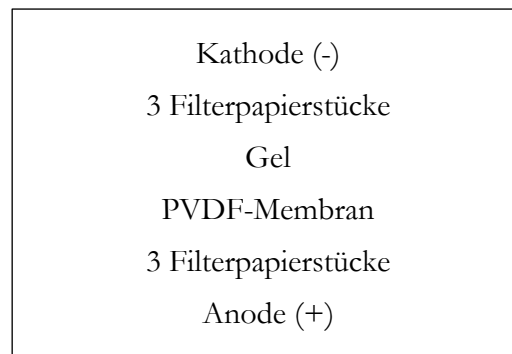


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Western Blots (*semi-dry*)

Pro Gel wurde eine Stromstärke von konstant 100 mA für 1 h angelegt. Dadurch wurden die aufgetrennten Proteine entlang des elektrischen Felds auf die Membran übertragen.

Nach dem Transfervorgang wurde die Membran in TBS-Puffer gewaschen und abhängig von der Größe des gesuchten Proteins in Streifen geschnitten. Der oben erwähnte *Spectra™ Multicolour Broad Range Protein Ladder Marker* diente als Orientierungshilfe.

Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu minimieren, wurde die Membran 1 h in 5 %-Milch-TBS-T-Puffer inkubiert.

3.2.4.3 Gel-Färbung

Nach dem Transfervorgang wurde das Elektrophoresegel über Nacht in Coomassie-Färbelösung inkubiert, um die Beladung des Gels zu kontrollieren. Am folgenden Tag wurde die Färbelösung entfernt und das Gel 30 min in Fixierlösung inkubiert. Anschließend folgte ein Entfärbungsschritt bis sich die Banden deutlich von dem Hintergrund abhoben.

3.2.4.4 Immunfärbung

Nach der Blockierung mit Milch-TBS-T-Puffer wurde die Membran dreimal 5 min in TBS-T-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem vorverdünnten Primärantikörper (s. Tabelle 3) inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgenommen und die Membran erneut dreimal 5 min in TBS-T-Puffer gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem vorverdünnten, gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (s. Tabelle 4) für 2 h bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Membran in TBS-Puffer bis zur Detektion zwischengelagert.

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper mit Verdünnungen und Inkubationszeiten (ü. N.= über Nacht, T = Temperatur)

Primärantikörper	Ursprung	Proteingröße (kDa)	Verdünnung	Lösungspuffer	Inkubationszeit	T
PCNA Monoclonal Antibody	Maus	35	1:1000	BSA-TBS-T	ü. N.	4 °C
HIF-1 α Antikörper	Kaninchen	90-120	1:1000	BSA-TBS-T	ü. N.	4 °C
Caspase-3 (8G10) Rabbit mAb	Kaninchen	17, 19, 35	1:1000	BSA-TBS-T	ü. N.	4 °C
Anti-Actin (A2066)	Kaninchen	42	1:10.000	Milk-TBS-T	ü. N.	4 °C

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper mit Verdünnungen und Inkubationszeiten

Sekundärantikörper	Ursprung	Verdünnung	Lösungspuffer	Inkubationszeit	Temperatur
Rabbit IgG (H+L chain) Antikörper	Ziege	1:30.000	Milch-TBS-T	2 h	Raumtemperatur
Mouse IgG (H+L chain) Antikörper	Kaninchen	1:30.000	Milch-TBS-T	2 h	Raumtemperatur

3.2.4.5 Detektion

Der Sekundärantikörper ist mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Zur Detektion der Proteinbande wurden 200 µl Luminata™ Forte auf die Membran aufgebracht. Über mehrere Zwischenschritte wurde dieses durch die Meerrettichperoxidase oxidiert, was zu einer deutlichen Chemilumineszenz führte. Dies wurde mit Hilfe einer *charge-coupled device* (CCD)-Kamera vom Typ LAS 4000 detektiert.

Zur Kontrolle der Proteinladung wurden die Membranstücke nach Detektion der Proteinbande 10 min in 1 molarer Natronlauge inkubiert, um Primär- und Sekundärantikörper von ihren Epitopen zu lösen. Nach dreimaligem 5-minütigem Waschen in TBS-T-Puffer wurde der Primärantikörper gegen Aktin aufgetragen. Am nächsten Morgen erfolgte erneut die Inkubation mit dem spezifischen Sekundärantikörper sowie die Detektion der Proteinbanden mittels *charge-coupled device*-Kamera.

3.3 Rattenmodell

Das von Marquet et al. (1984) in den 1980er entwickelte kolorektale Metastasenmodell beruhte auf der Induktion eines kolorektalen Adenokarzinoms durch 1,2-Dimethylhydrazin in WAG/Rij-Ratten. Anfänglich handelte es sich um einen transplantablen Tumor (Marquet et al. 1984).

Die durch Thomas et al. (1993) etablierte Zelllinie dieses Tumors ermöglicht die Injektion von Zellen in die *Vena portae hepatis* oder *Vena mesocolica*. Dies führt zur Entwicklung von Lebermetastasen, welche ein diffuses Wachstum in der gesamten Leber zeigen. Daher stellt es ein realitätsnahes Modell für die hämatogene Metastasierung des kolorektalen Karzinoms dar (Thomas et al. 1993). Zur Bestimmung des Tumolvolumens mittels Sonographie ist es aber aufgrund des multifokalen Metastasenwachstums ungeeignet.

Durch die subkapsuläre Injektion der Tumorzellen kann ein unifokaler solider Tumor induziert werden. Aufgrund der Lage ist dieser gut sonographisch darstellbar und zeigt trotzdem eine realitätsnahe Angiogenese und Proliferation (Kollmar et al. 2004; Sperling et al. 2012).

Die im Folgenden beschriebenen Materialien und Methoden wurden im Rahmen dieser Studie erstmals in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen etabliert.

3.3.1 Versuchstiere

Die Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes von Frau Dr. Anne Kauffels-Sprenger durchgeführt. Das Projekt ist durch das niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz (Aktenzeichen 14/1610) genehmigt worden.

Für die Versuche wurden männliche WAG/Rij-Ratten verwendet. Diese wurden während des gesamten Versuchszeitraums in der zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen bei 22 ± 1 °C und 55 ± 10 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Sie waren einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt und erhielten Wasser ad libitum sowie Standardfutter.

3.4 Versuchsabschnitt II: Bestimmung der molekularen Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung

3.4.1 Zeitlicher Ablauf

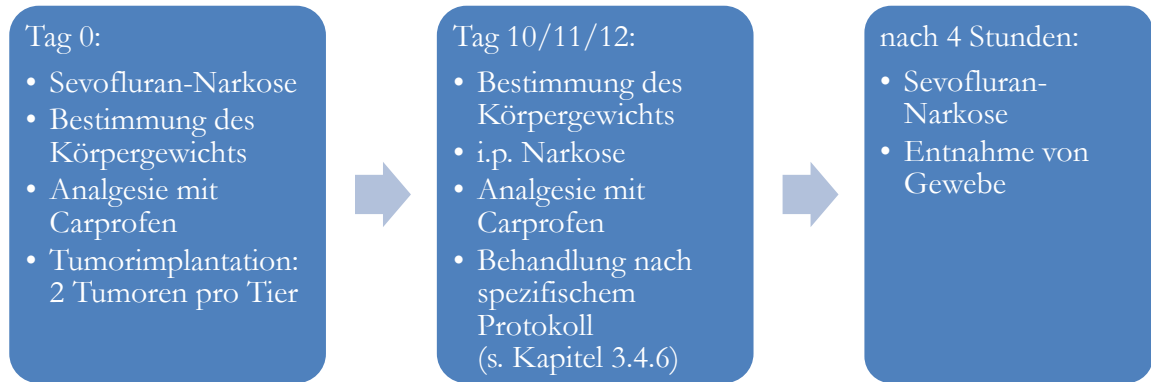


Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf des Versuchsabschnitts II: Bestimmung der molekularen Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung

3.4.2 Tumorimplantation

An Tag 0 erfolgte die Tumorimplantation unter Sevofluran-Narkose (7 % zur Einleitung, 3 % zum Aufrechterhalten der Narkose). Nach der Bestimmung des Körpergewichts wurde die Ratte zunächst ventralseitig rasiert und in Rückenlage auf einer Heizplatte mit Pflasterstreifen fixiert. Zur Analgesie wurde Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht (KG)) subkutan (*s.c.*) appliziert. Nach einer medianen Laparotomie über etwa 1,5 cm wurden 5×10^5 Zellen/100 μ l PBS pro Tumor subkapsulär in den linken und den medianen Leberlappen über eine 27 G-Kanüle injiziert. Um Nachblutungen zu vermeiden, wurde die Injektionsstelle kurzzeitig mit geringem Druck unter Verwendung eines Wattestäbchens komprimiert. Anschließend wurde die Laparotomiewunde mit einer fortlaufenden allschichtigen 4-0 PDS-Naht verschlossen.

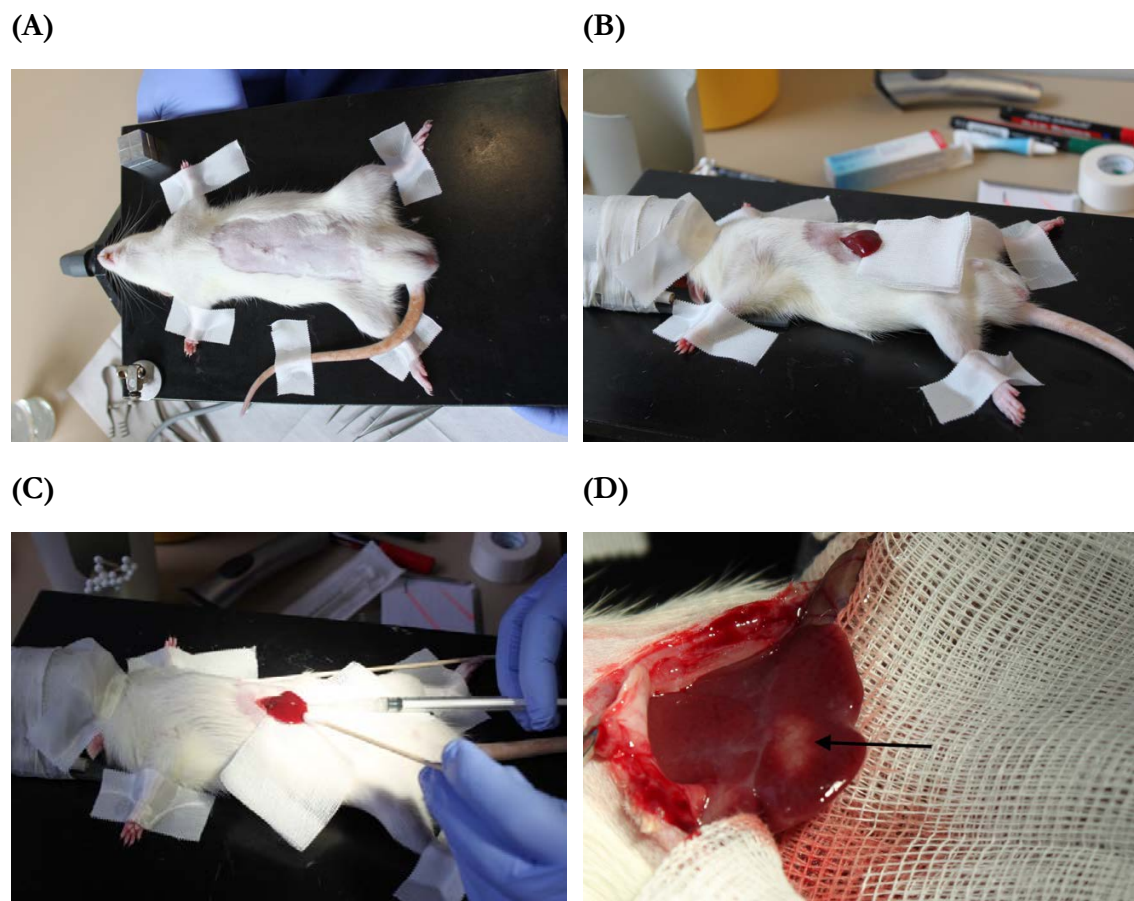


Abbildung 6: Tumorimplantation. Fixierung der Ratte auf der Heizplatte (A), mediane Laparotomie und Ausklappen des linken Leberlappens (B), Injektion der Zellsuspension (C), Tumor in situ nach 10 Tagen (D).

3.4.3 Hepatoarterielle Infusion

Zehn Tage nach der Tumorimplantation wurde eine Re-Laparotomie durchgeführt. Die Anästhesie erfolgte mit Ketamin (70 mg/kg KG) und Cepetor (0,3 mg/kg KG) intraperitoneal (*i.p.*) und die Analgesie mit Carprofen (5 mg/kg KG *s.c.*). Nach der Eröffnung des Abdomens erfolgte die Darstellung der *Arteria gastroduodenalis*. Diese wurde distal mit einem 4-0 Seidenfaden ligiert und ein 7-0 Vicryl Faden wurde um die Arterie zur Befestigung des Katheters vorgelegt. Anschließend wurde die *Arteria gastroduodenalis* proximal am Abgang der *Arteria hepatica* mittels feiner Goldklemme temporär verschlossen. Der Katheter wurde durch eine kleine Inzision in die Arterie eingeführt und bis zur Goldklemme vor den Abgang der *Arteria hepatica* vorgeschoben. Per Ligatur des vorgelegten Fadens wurde der Katheter intraluminal fixiert. Nach Entfernen der Goldklemme konnte durch den Rückfluss des Blutes im Katheter dessen korrekte Lage bestätigt werden. Anschließend erfolgte die Applikation des jeweiligen Zytostatikums und/oder Embolisatgemischs über einen angeschlossenen Dreivegehahn mit Hilfe einer 1-ml-Spritze. Nach der HAI wurde der Katheter mit 0,3 ml NaCl 0,9 % gespült, um die vollständige Injektion der Wirkstoffe sicherzustellen. Nach dem Entfernen des Katheters wurde die Arterie mittels eines 4-0 Seidenfadens ligiert. Abschließend wurde die Laparotomiewunde mit einer fortlaufenden allschichtigen 4-0 PDS-Naht verschlossen.

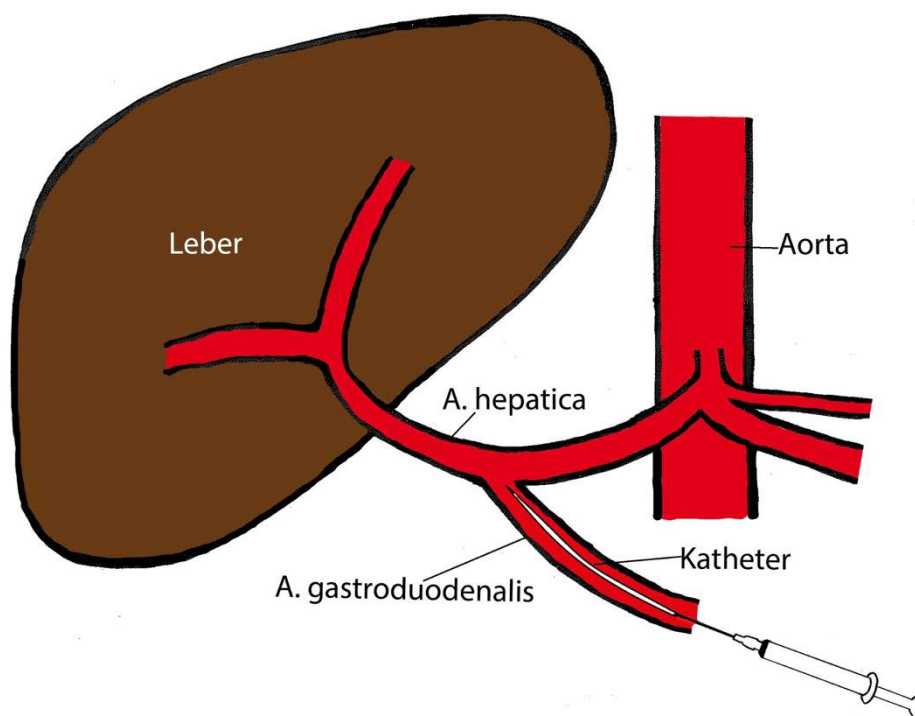
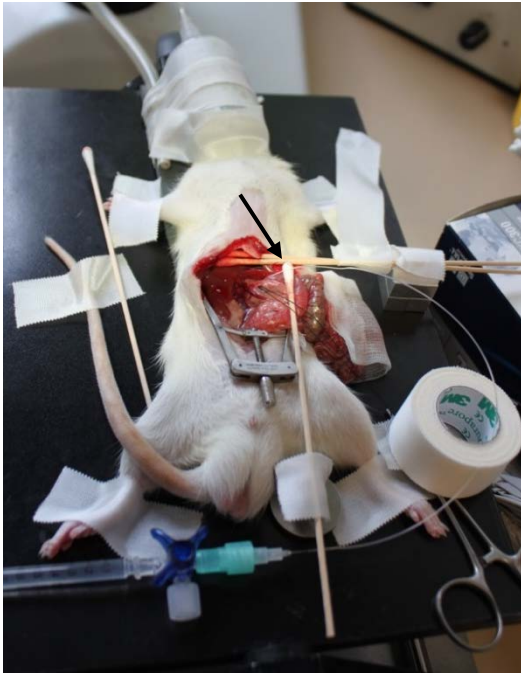


Abbildung 7: Schematische Darstellung der hepatoarteriellen Infusion. A. gastroduodenalis = *Arteria gastroduodenalis*, A. hepatica = *Arteria hepatica*.

(A)



(B)

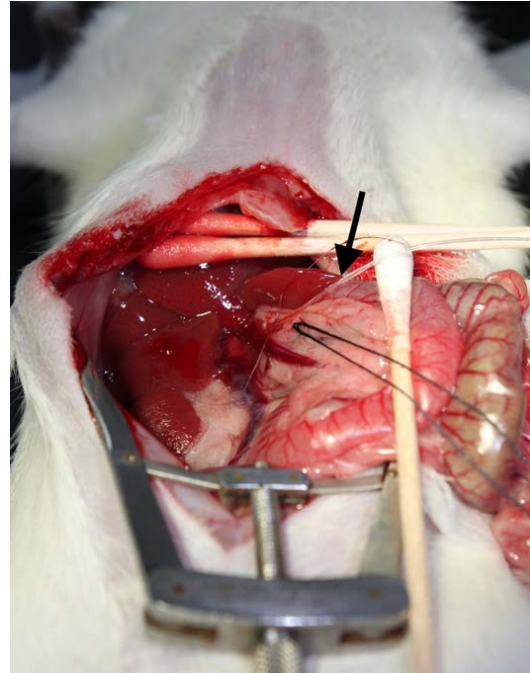


Abbildung 8: Hepatoarterielle Infusion. Applikation der Medikamente per Katheter (A). Intraabdomnielle Lage des Katheters (B). Der Katheter ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

3.4.4 Systemische Applikation

Zehn Tage nach der Tumorimplantation wurde eine Re-Laparotomie durchgeführt. Die Anästhesie erfolgte mit Ketamin (70 mg/kg KG) und Cepetor (0,3 mg/kg KG) *i.p.* und die Analgesie mit Carprofen (5 mg/kg KG *s.c.*). Die systemische Applikation erfolgte mit Hilfe einer 27 G Kanüle und einer 1-ml-Spritze. Nach Freilegung der *Vena cava inferior* wurde zunächst das Peritoneum auf Höhe der Iliacalgefäße punktiert und die Nadel subperitoneal etwa 5mm vorgeschoben. Danach erfolgte die Punktion der *Vena cava inferior*. Nach erfolgreicher Applikation wurde die Punktionsstelle mit Hilfe des intakten Peritoneums bedeckt und durch leichten Druck mit einem Wattestäbchen komprimiert. Abschließend wurde die Laparotomiewunde mit einer fortlaufenden allschichtigen Naht mit 4-0 PDS verschlossen.

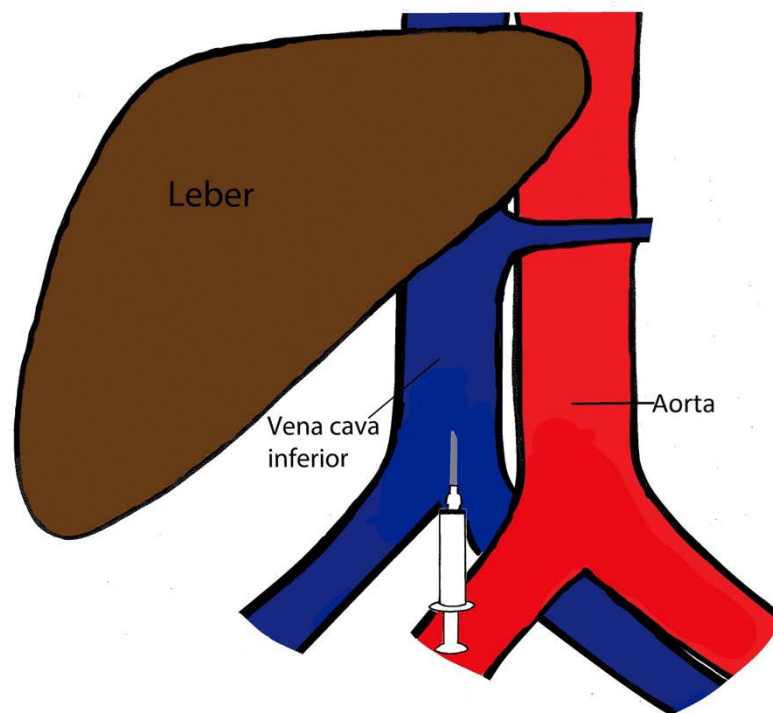


Abbildung 9: Schematische Darstellung der systemischen Applikation in die *Vena cava inferior*

3.4.5 Gewebeentnahme

Die komplette Leber mit den Tumoren wurde vier Stunden nach der Behandlung entnommen und in PBS gesäubert. Das Tumor- und das gesunde Lebergewebe wurden in je drei Teile geschnitten. Für die immunhistochemische Färbung (IHC) wurde je eine Gewebeprobe in 4 %-PBS-gepufferten Formalin fixiert.

3.4.6 Protokoll

Für die Versuche dieses Versuchsabschnitts wurden insgesamt 59 WAG/Rij-Ratten verwendet. Diese wurden in zwei Hauptgruppen eingeteilt (1. Irinotecan-Gruppe, 2. Onivyde®-Gruppe). Die Tiere wurden an Tag 10, 11 oder 12 nach der Tumorimplantation entweder mit einer HAI oder mit einer systemischen Applikation nach unterschiedlichen Therapieschemata (s. unten) behandelt. Vier Stunden nach der Behandlung wurden unter Sevofluran-Narkose (7 % zur Einleitung, 3 % zum Aufrechterhalten der Narkose) die tumortragende Leber und Blut entnommen und die Tiere getötet. Den Tieren der Kontrollgruppe (SHAM) wurde NaCl 0,9 % per HAI appliziert.

Anschließend erfolgte die IHC der in Formalin-fixierten Gewebeproben.

3.4.6.1 Irinotecan-Gruppe

Tabelle 5: Behandlungsgruppen der Irinotecan-Gruppe des Versuchsabschnitts II: Bestimmung der molekularen Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung

Subgruppe	Appliziertes Therapeutikum (Dosis)	Anzahl der Tiere
HAI mit NaCl 0,9 % (SHAM)	NaCl 0,9 % (200 µl)	7
Systemisch Irinotecan (SYS IRI)	Irinotecan (90 mg/m ²)	7
HAI mit Irinotecan (HAI IRI)	Irinotecan (90 mg/m ²)	7
HAI mit Irinotecan + EmboCept® S (HAI Embo+ IRI)	Irinotecan (90 mg/m ²) + EmboCept® S (400 µl)	7
HAI mit Irinotecan + Tandem™ 40 µm (HAI Tandem + IRI)	Irinotecan (90 mg/m ²) + Tandem™ 40 µm	7

3.4.6.2 Onivyde®-Gruppe

Tabelle 6: Behandlungsgruppen der Onivyde®-Gruppe des Versuchsabschnitts II: Bestimmung der molekularen Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung

Subgruppe	Appliziertes Therapeutikum (Dosis)	Anzahl der Tiere
Systemisch Onivyde® (SYS nal IRI)	Onivyde® (90 mg/m ²)	8
HAI mit Onivyde® (HAI nal IRI)	Onivyde® (90 mg/m ²)	8
HAI mit Onivyde® + EmboCept® S (HAI Embo+ nal IRI)	Onivyde® (90 mg/m ²) + EmboCept® S (400 µl)	8

3.4.7 Histologie

3.4.7.1 Anfertigung von Schnitten

Das entnommene Gewebe wurde für 48 h in 4 %-PBS-gepufferten Formalin fixiert und über eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol im Leica TP1020 entwässert. Anschließend wurde es in Paraffin eingebettet.

Aus den Paraffinblöcken wurde mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms Schnitte mit einer Dicke von 2 μm angefertigt. Diese wurden im Wasserbad auf adhärente Objektträger aufgebracht und 12 h bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet.

3.4.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Alle Proben wurden zur Beurteilung der Leber- und Tumormorphologie mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Zum Entparaffinieren der Schnitte wurden diese zweimal 5 min in Xylol und anschließend je 2 min in einer absteigenden Alkoholreihe inkubiert und mit zweifach destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden sie 5 min mit Hämatoxylin gefärbt und 10 min in warmem Leitungswasser gebläut. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte 30 s in Eosin Y inkubiert. Nach abschließendem Spülen mit zweifach destilliertem Wasser erfolgte das Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol.

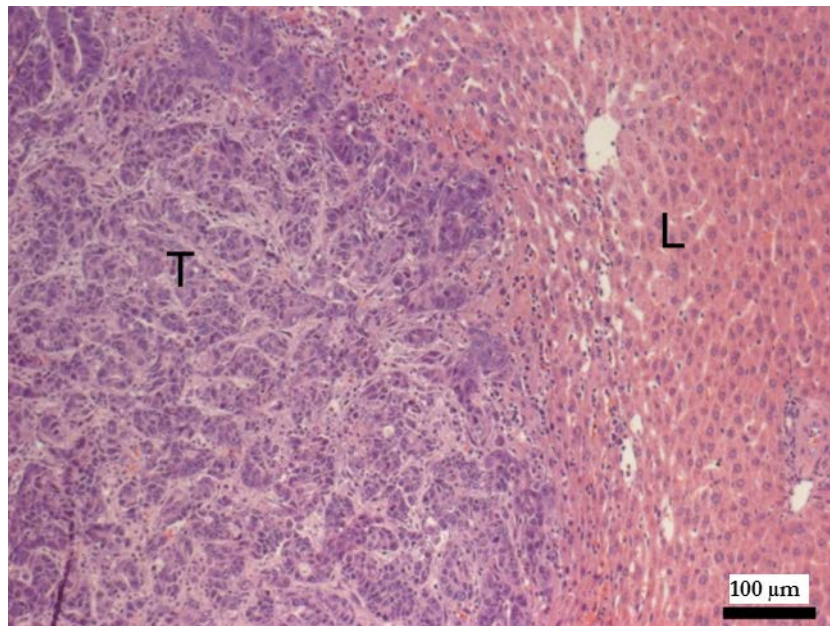


Abbildung 10: HE-Färbung des Tumors und des angrenzenden Lebergewebes in 100-facher Vergrößerung. T = Tumor, L = Leber.

3.4.7.3 Immunhistochemische Färbung

Immunhistochemische Färbungen (IHC) dienen dem Nachweis von spezifischen Gewebeeigenschaften, sog. Epitope, z. B. zur Differenzierung des Gewebes. Dies basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion des Primärantikörpers gegen das zu untersuchende Epitop. Nach dem Auftragen des spezifischen Primärantikörpers kommt es zur Bindung dessen am Epitop. Als nächstes wird zur Signaldetektion ein Sekundärantikörper im Überschuss aufgebracht, der gegen den konstanten Teil des Primärantikörpers gerichtet ist. Der Sekundärantikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt. Dies ist das Enzym Peroxidase. Durch Auftragen des spezifischen Chromogens, Diaminobenzin (DAB), kommt es am Ort des Epitops zu einer bräunlichen Farbreaktion und zu dessen Nachweis. Zur besseren Darstellung der Morphologie erfolgt zusätzlich das Gegenfärben der Zellkerne mit Hämalaun, welche daraufhin blau zur Darstellung kommen (Lang 2006).

Ein Störfaktor der IHC kann die endogene Peroxidase-Aktivität der Zellen sein, wodurch fälschlicherweise mehr Chromogen umgesetzt wird. Daher muss man diese durch spezielle Stoffe blockieren. Bei zu hohen Konzentrationen und zu langen Inkubationszeiten des Primärantikörpers kann es zusätzlich zur unspezifischen Hintergrundfärbung kommen (Signal-Rausch-Relation). Bei der Fixierung der Präparate kann es zur Vernetzung der Epitope kommen. Daher muss man vor der Färbung eine Antigendemaskierung durch Hitze oder Proteolyse durchführen. Daher ist es bei der Etablierung des Primärantikörpers notwendig, die Verdünnung, die Inkubationszeit, die Blockierungsreaktion sowie die Antigendemaskierung anzupassen (Lang 2006).

3.4.7.3.1 Automatisiertes Färben

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mittels des *BenchMark XT* Färbeautomaten. Durch die standardisierte Färbung aller Schnitte konnte eine gleichbleibende Qualität der Färbung gewährleistet und somit eine hohe Vergleichbarkeit erreicht werden.

Um die Vernetzung der Epitope durch die Paraffinfixierung zu lösen, musste vor dem Färben eine Antigendemaskierung stattfinden. Dazu wurde der *cell conditioner 1* (CC1) aufgetragen und die Proben auf 100 °C für 60 min erhitzt. Anschließend wurden die Schnitte mit den vorverdünnten Primärantikörpern bei 37 °C inkubiert.

Zur Detektion der Epitope wurde anschließend das *ultraView Universal DAB Detection Kit* aufgetragen. Dieses enthält spezifische Sekundärantikörper gegen Maus- und Kaninchenprimärantikörper sowie das Chromogen DAB. Dadurch werden positive Zellen braun angefärbt. Nach Beendigung der Färbung werden alle Schnitte abgespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert. Anschließend werden sie mit einem Deckglas geschützt.

3.4.7.3.2 Primärantikörper

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-Antikörper

Das Protein PCNA kommt speziell im Zellkern vor. Es ist ein wichtiges Protein in der Replikation der DNA. Unter Bildung eines Ringes verhindert es die Dissoziation der Polymerase von der DNA. Daher ist PCNA ein wichtiger Indikator für Zellen, die sich in Proliferation befinden (The Human Protein Atlas PCNA).

Als Primärantikörper diente ein monoklonaler Anti-PCNA-Mausantikörper. Dieser wurde in der Verdünnung 1:1500 für 24 min bei 37 °C inkubiert. Pro Tumorschnitt wurden zehn *high power fields* (HPFs) in 400-facher Vergrößerung verblindet beurteilt. Es wurde jeweils der Anteil der PCNA-positiven Zellen pro HPF geschätzt und anhand eines vorbeschriebenen Schemas ausgewertet (Sperling et al. 2012):

- 0: ≤ 1 % PCNA-positive Tumorzellen
- 1: 1-10 % PCNA-positive Tumorzellen
- 2: 10-30 % PCNA-positive Tumorzellen
- 3: 30-50 % PCNA-positive Tumorzellen
- 4: ≥ 50 % PCNA-positive Tumorzellen

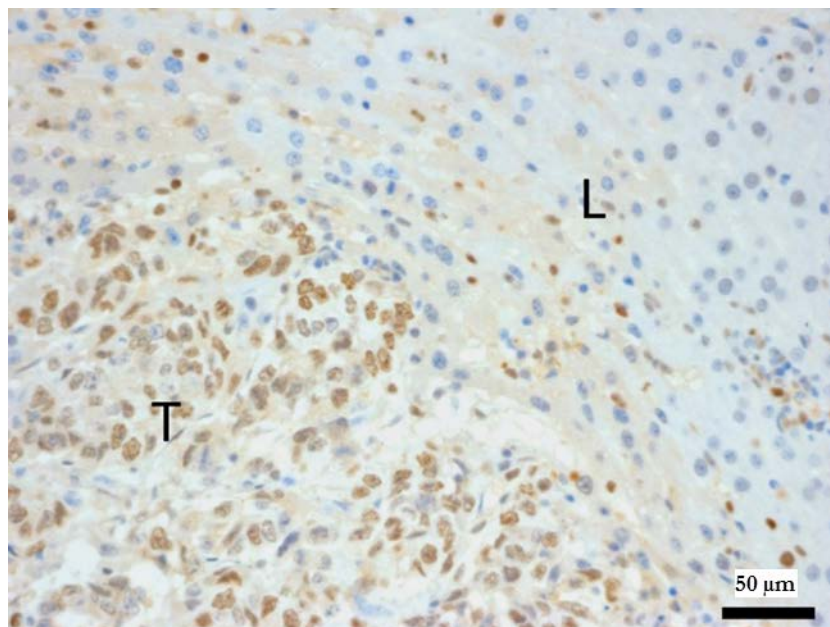


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen PCNA in 200-facher Vergrößerung. Abgebildet ist der Übergang zwischen Leber (L) und KRLM (T). Die PCNA-positiven Zellen sind deutlich braun angefärbt.

γ H2AX-Antikörper

H2AX ist eine Variante des H2A-Histonproteins im Zellkern, welches an der Bildung des Chromatins sowie an der DNA-Reparatur beteiligt ist. Bei DNA-Doppelstrangbrüchen wird das Serin139 phosphoryliert und H2AX umbenannt in γ H2AX. Es ist ein sehr sensibler, früher Nachweis für DNA-Doppelstrangbrüche, z. B. induziert durch Chemotherapeutika (Kuo und Yang 2008).

Als Primäntikörper diente ein polyklonaler Anti- γ H2AX-Kaninchenantikörper. Dieser wurde in der Verdünnung 1:100 für 24 min bei 37 °C aufgetragen. Pro Tumor- und Leberschnitt wurden je maximal zehn HPFs in 400-facher Vergrößerung verblindet ausgewertet. Aus der Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen pro HPF wurde der Median pro Leber bzw. Tumor errechnet.

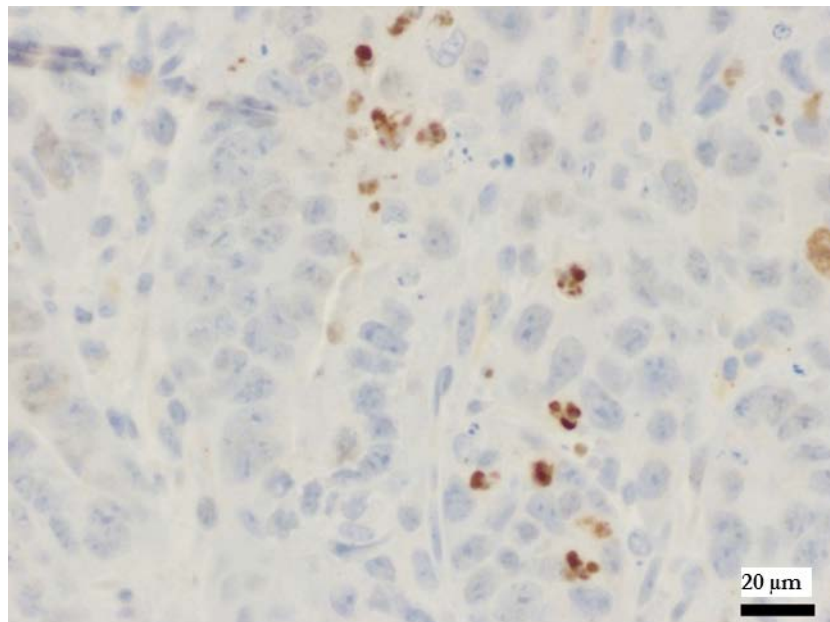


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen γ H2AX in 400-facher Vergrößerung

Hypoxie-induzierter-Faktor 1 α (HIF-1 α)-Antikörper

HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor, der bei Hypoxie an das *Hypoxia-Response-Element* bindet. Dadurch aktiviert er unter anderem die Bildung von Erythropoetin und VEGF, wodurch die Erythropoese und die Angiogenese stimuliert werden. Bei Normoxie wird HIF-1 α hydroxyliert und im Proteasom abgebaut. Daher zeigt er in der IHC in Hypoxie befindliche Zellen an (Schofield und Ratcliffe 2004).

Als Primärantikörper diente ein polyklonaler Anti-HIF-1 α -Kaninchenantikörper. Dieser wurde in der Verdünnung 1:200 für 20 min bei 37 °C aufgebracht. Pro Tumor- und Leberschnitt wurden je maximal zehn HPFs verblindet ausgewertet. Die HPFs wurden mittels folgenden Auswertungsschemas, modifiziert nach Zhong et al. (1999), bewertet:

- 0: keine Färbung
- 1: 1-5 % positive Kerne &/oder zytoplasmatische Färbung aller Zellen
- 2: 5-10 % positive Kerne &/oder zytoplasmatische Färbung aller Zellen
- 3: 10-50 % positive Kerne &/oder zytoplasmatische Färbung aller Zellen
- 4: >50 % positive Kerne &/oder zytoplasmatische Färbung aller Zellen

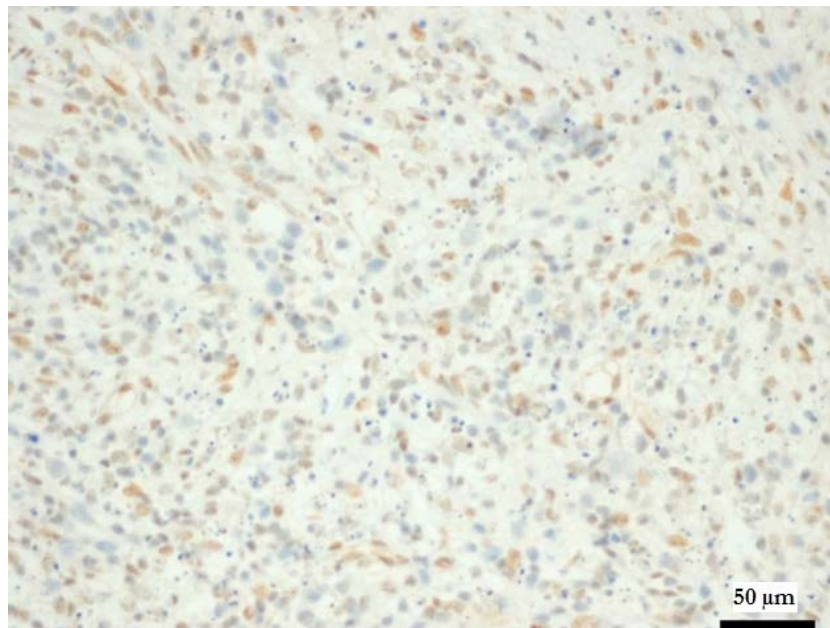


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen HIF-1 α in 200-facher Vergrößerung

Cystein-dependent aspartat-specific Protease 3 (CASPASE-3)-Antikörper

CASPASE-3 spielt eine wichtige Rolle in der Apoptose von Zellen. Es bestehen zwei Möglichkeiten zur Aktivierung der Apoptose. Zum einen wird der intrinsische Weg der Apoptose durch DNA-Schäden, Hypoxie oder osmotischen Stress ausgelöst. Dies aktiviert den Transkriptionsfaktor p53, so dass mehr pro-apoptotische Proteine (Bax und Bid) gebildet werden. Diese führen zu einer erhöhten Mitochondrienpermeabilität. Dadurch gelangt Cytochrom C ins Zytosol und bildet zusammen mit CASPASE-9 und Apaf-1 das Apoptosom. Dieses aktiviert CASPASE-3. Zum anderen führt auch der extrinsische Weg zur Aktivierung der CASPASE-3. Er wird ausgelöst durch bestimmte Liganden, die an den Todesrezeptor der Zellmembran binden. Dieser führt zur Aktivierung der CASPASE-8, die wiederum die CASPASE-3 aktiviert. Diese induziert zusammen mit CASPASE-6 und 7 die eigentliche Apoptose: Kondensation des Chromatins, Lösen aus dem Zellverband und Fragmentierung des Zellkerns. Anschließend werden die Reste durch Makrophagen phagozytiert (Netzker 2012). Daher wird während der IHC CASPASE-3 hauptsächlich im Zytoplasma der Zellen angefärbt und stellt einen Indikator für apoptotische Zellen dar (The Human Protein Atlas CASP3).

Als Primärantikörper diente ein monoklonaler Anti-CASPASE-3-Kaninchenantikörper. Dieser wurde in der Verdünnung 1:1000 für 24 min bei 37 °C aufgetragen. Pro Tumor- und Leberschnitt wurden maximal zehn HPFs in 400-facher Vergrößerung verblindet ausgewertet. Es wurden nur Zellen mit einer zelltypischen Morphologie gewertet. Aus der Anzahl der CAPASE-3-positiven Zellen pro HPF wurde der Median pro Leber bzw. Tumor errechnet.

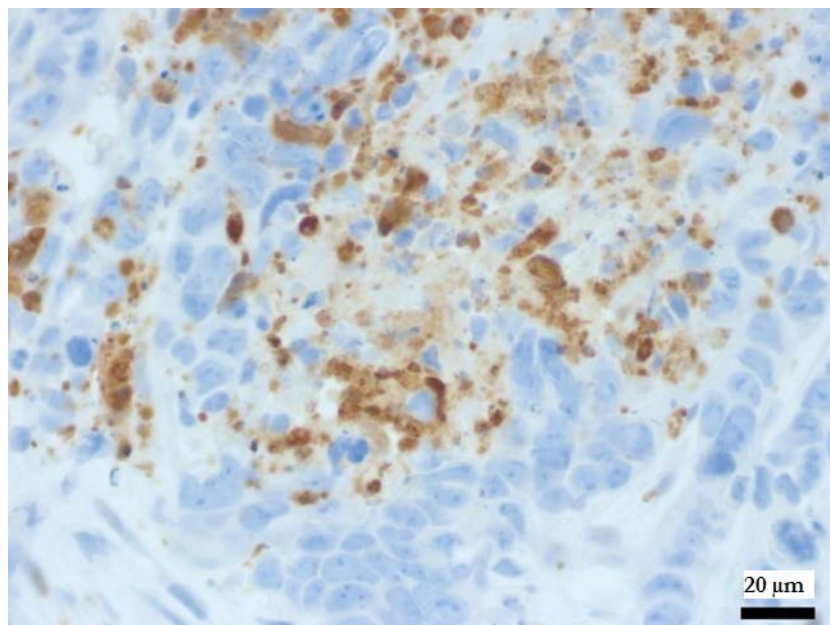


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen CASPASE-3 in 400-facher Vergrößerung

3.5 Versuchsabschnitt III: Bestimmung des Tumorsprechens

3.5.1 Zeitlicher Ablauf

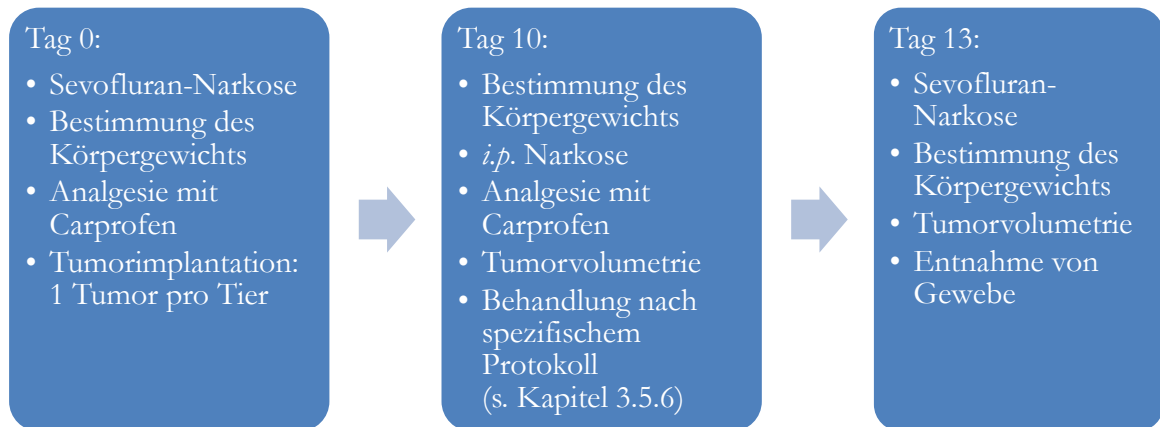


Abbildung 15: Zeitlicher Ablauf des Versuchsabschnitts III: Bestimmung des Tumorsprechens

3.5.2 Tumorimplantation

An Tag 0 erfolgte die Tumorimplantation unter Sevofluran-Narkose (7 % zur Einleitung, 3 % zum Aufrechterhalten der Narkose). Nach der Bestimmung des Körpergewichts wurde die Ratte zunächst ventralseitig rasiert und in Rückenlage auf einer Heizplatte mit Pflasterstreifen fixiert. Zur Analgesie wurde Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht (KG)) subkutan (*s.c.*) appliziert. Nach einer medianen Laparotomie über etwa 1,5 cm wurden 5×10^5 Zellen/100 μ l PBS pro Tumor subkapsulär in den linken über eine 27 G-Kanüle injiziert. Um Nachblutungen zu vermeiden, wurde die Injektionsstelle kurzzeitig mit geringem Druck unter Verwendung eines Wattestäbchens komprimiert. Anschließend wurde die Laparotomiewunde mit einer fortlaufenden allschichtigen Naht mit 4-0 PDS verschlossen. Bilder siehe Kapitel 3.4.2.

3.5.3 Tumorvolumenbestimmung

Die Tumorvolumenbestimmung erfolgte sowohl an Tag 10 als auch an Tag 13 mittels Kleintiersonographie mit dem Mikroultraschallgerät Vevo2100. Dazu wurde das Tier unter Sevofluran-Narkose (7 % zur Einleitung, 3 % zum Aufrechterhalten der Narkose) in Rückenlage auf der Heizplatte fixiert. Das Ultraschallgel wurde auf das geschlossene Abdomen aufgetragen und der Ultraschallkopf (MS400, 30 MHz) in der dafür vorgesehenen Apparatur über der Leber fixiert. Nach Identifikation des Tumors wurde an dessen größter Ausdehnung die Höhe, Breite und Länge bestimmt und das Tumorvolumen errechnet.



Abbildung 16: Tumorvolumetrie mittels Kleintiersonographie

3.5.4 Hepatoarterielle Infusion

Zehn Tage nach der Tumorimplantation wurde die HAI entsprechend dem Kapitel 3.4.3 durchgeführt.

3.5.5 Gewebeentnahme

Die komplette Leber mit den Tumoren wurde 72 Stunden nach der Behandlung entnommen und in PBS gesäubert. Das Tumor- und das gesunde Lebergewebe wurden in je zwei Teile geschnitten. Für die IHC wurde je eine Gewebeprobe in 4 % PBS-gepufferten Formalin fixiert. Zur Asservation wurde je eine Probe in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt. Die Blutproben wurden ebenfalls abzentrifugiert. Das überstehende Serum und das Zellpellet wurden getrennt bei -20 °C aufbewahrt.

3.5.6 Protokoll

Für diesen Versuchsabschnitt wurden 32 männliche WAG/Rij-Ratten verwendet. Diese wurden in vier Gruppen mit je acht Tieren randomisiert. Die Tiere wurden an Tag 10 nach der Tumorimplantation entweder mit einer HAI oder mit einer systemischen Applikation nach unterschiedlichen Therapieschemata (s. unten) behandelt. Außerdem wurde unter Sevofluran-Narkose (7 % zur Einleitung, 3 % zum Aufrechterhalten der Narkose) eine Tumolvolumenbestimmung mittels Kleintiersonographie durchgeführt.

An Tag 13 nach der Tumorimplantation wurde unter Sevofluran-Narkose (7 % zur Einleitung, 3 % zum Aufrechterhalten der Narkose) erneut das Tumolvolumen bestimmt, nach Re-Laparotomie die Leber entnommen und das Tier getötet. Die Tiere der Kontrollgruppe (SHAM) erhielten eine HAI mit NaCl 0,9 %.

Es erfolgte anschließend die weitere Analyse der in Formalin-fixierten Proben mittels IHC.

Tabelle 7: Behandlungsgruppen des Versuchsabschnitts III: Bestimmung des Tumoransprechens

Gruppe	Appliziertes Therapeutikum (Dosis)	Anzahl der Tiere
HAI mit NaCl 0,9 % (SHAM)	NaCl 0,9 % (200 µl)	8
HAI mit Onivyde® (HAI nal IRI)	Onivyde® (90 mg/m ²)	8
HAI mit EmboCept® S (HAI Embo)	EmboCept® S (400 µl einer 7,5g/ml Lösung)	8
HAI mit Onivyde® + EmboCept® S (HAI Embo +nal IRI)	Onivyde® (90 mg/m ²) + EmboCept® S (400 µl)	8

3.5.7 Histologie

3.5.7.1 Anfertigung von Schnitten

Das Anfertigen der Schnitte erfolgte entsprechend dem Kapitel 3.4.7.1 des Versuchsabschnitts II.

3.5.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung des Leber- und Tumorgewebes erfolgte entsprechend dem Kapitel 3.4.7.2 des Versuchsabschnitts II.

3.5.7.2.1 Leberzellschädigung

Zur Beurteilung einer möglichen Leberzellschädigung wurden zehn HPFs der gesunden Leber in HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung im Hinblick auf Zellkerndeformation, Vakuolisierung und Grobscholligkeit des Zytoplasmas analysiert. Die Ergebnisse wurden mittels nachfolgendem Schema ausgewertet (Calabrese et al. 1997; Sperling et al. 2012):

- 0: keine Ausprägung des Merkmals
- 1: <30 % der Hepatozyten zeigten das Merkmal
- 2: 40-70 % der Hepatozyten zeigten das Merkmal
- 3: >70 % der Hepatozyten zeigten das Merkmal

3.5.7.3 Immunhistochemische Färbung

Der Ablauf der IHC entspricht dem Kapitel 3.4.7.3 des Versuchsabschnitts II.

3.5.7.3.1 Primärantikörper

PCNA-Antikörper

Als Primärantikörper diente ein monoklonaler Anti-PCNA-Mausantikörper. Dieser wurde in der Verdünnung 1:1500 für 24 min bei 37 °C inkubiert. Pro Tumorschnitt wurden zehn *high power fields* (HPFs) in 400-facher Vergrößerung verblindet beurteilt. Es wurde jeweils der Anteil der PCNA-positiven Zellen pro HPF geschätzt und anhand eines vorbeschriebenen Schemas ausgewertet (Sperling et al. 2012):

- 0: ≤ 1 % PCNA-positive Tumorzellen
- 1: 1-10 % PCNA-positive Tumorzellen
- 2: 10-30 % PCNA-positive Tumorzellen
- 3: 30-50 % PCNA-positive Tumorzellen
- 4: ≥ 50 % PCNA-positive Tumorzellen

γ H2AX-Antikörper

Als Primärantikörper diente ein polyklonaler Anti- γ H2AX-Kaninchenantikörper. Dieser wurde in der Verdünnung 1:100 für 24 min bei 37 °C aufgetragen. Pro Tumor- und Leberschnitt wurden je maximal zehn HPFs in 400-facher Vergrößerung verblindet ausgewertet. Aus der Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen pro HPF wurde der Median pro Leber bzw. Tumor errechnet.

HIF-1 α -Antikörper

Als Primärantikörper diente ein polyklonaler Anti-HIF-1 α -Kaninchenantikörper. Dieser wurde in der Verdünnung 1:200 für 20 min bei 37 °C aufgebracht. Pro Tumor- und Leberschnitt wurden je maximal zehn HPFs verblindet ausgewertet. Die HPFs wurden mittels folgenden Auswertungsschemas, modifiziert nach Zhong et al. (1999), bewertet:

- 0: keine Färbung
- 1: 1-5 % positive Kerne &/oder zytoplasmatische Färbung aller Zellen
- 2: 5-10 % positive Kerne &/oder zytoplasmatische Färbung aller Zellen
- 3: 10-50 % positive Kerne &/oder zytoplasmatische Färbung aller Zellen
- 4: > 50 % positive Kerne &/oder zytoplasmatische Färbung aller Zellen

CASPASE-3-Antikörper

Als Primärantikörper diente ein monoklonaler Anti-CASPASE-3-Kaninchenantikörper. Dieser wurde in der Verdünnung 1:1000 für 24 min bei 37 °C aufgetragen. Pro Tumor- und Leberschnitt wurden maximal zehn HPFs in 400-facher Vergrößerung verblindet ausgewertet. Es wurden nur Zellen mit einer zelltypischen Morphologie gewertet. Aus der Anzahl der CAPASE-3-positiven Zellen pro HPF wurde der Median pro Leber bzw. Tumor errechnet.

Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-Antikörper

PECAM-1 (CD31) wird hauptsächlich von Endothel, glatter Muskulatur, Monozyten und Thrombozyten gebildet und ist meist membranständig. Es ist verantwortlich für die interzellulären Verbindungen, Leukozytenmigration und Angiogenese. Daher wird es als Indikator für Angiogenese und Vaskularisation genutzt (The Human Protein Atlas PECAM1).

Als Primärantikörper diente ein polyklonaler Anti-CD31-Kaninchenantikörper. Dieser wurde in der Verdünnung 1:150 für 24 min bei 37 °C aufgetragen. Pro Tumor- und Leberschnitt wurden je maximal zehn HPFs in 400-facher Vergrößerung verblindet ausgewertet. Aus der Anzahl der PECAM-1-positiven Gefäßen wurde der Median pro Leber bzw. Tumor errechnet.

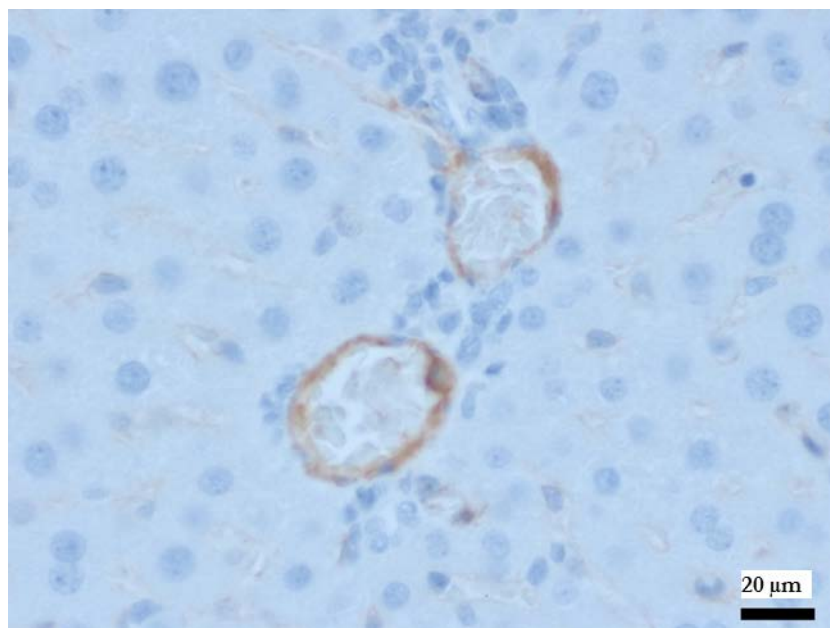


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung der Gefäße mit dem Antikörper gegen PECAM-1 in 400-facher Vergrößerung

3.6 Statistische Auswertung

Die Daten wurden zunächst handschriftlich erfasst und anschließend in das Datenerfassungsprogramm Excel übertragen. Es wurden der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler der Mittelwerte (*Standard error of the mean*, SEM) pro Tumor bzw. Leber berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software STATISTICA. Nach der Analyse der Normalverteilung mittels Quantil-Quantil-Plot erfolgte der gepaarte Vergleich mittels Student's t-Test (für eine normalverteilte Kohorte) oder Mann-Whitney-U-Test (für eine nicht normalverteilte Kohorte). Die graphische Darstellung erfolgte mit der Software Grapher™ 8. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Alle dargestellten Werte werden als Mittelwert \pm SEM angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsabschnitt I: *In-vitro*-Versuche

Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression von CC531-Zellen im Hinblick auf Proliferation (Antikörper gegen PCNA), Hypoxie (Antikörper gegen HIF-1 α) und Apoptose (Antikörper gegen *cleaved* CASPASE-3) nach der Behandlung mit Irinotecan in unterschiedlichen Konzentrationen *in vitro* untersucht.

4.1.1 Proliferation

In Triplikaten konnte nachgewiesen werden, dass die Höhe der gewählten Konzentration von Irinotecan mit der Expression von PCNA positiv korrelierte.

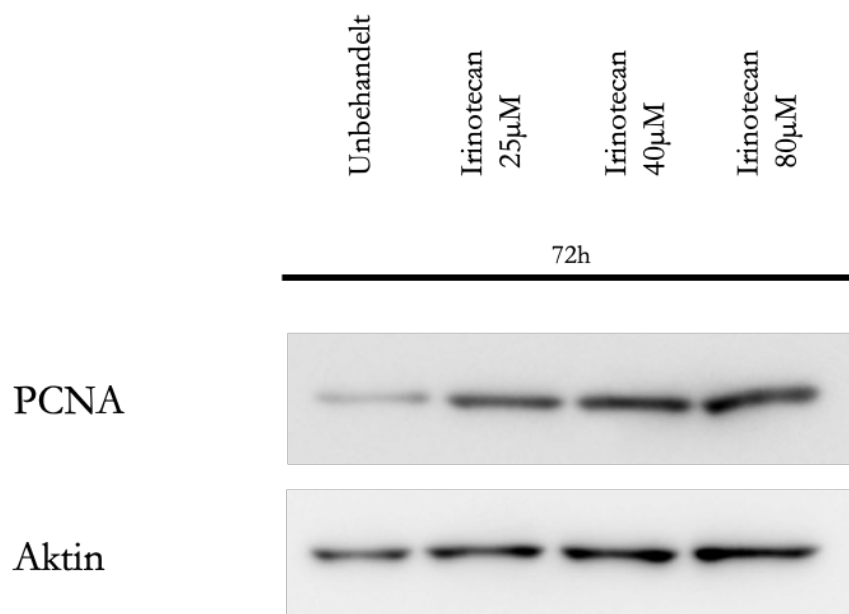


Abbildung 18: Analyse der Expression von PCNA in CC531-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Irinotecan *in vitro*. Der Nachweis von Aktin diente der Proteinladekontrolle.

4.1.2 Hypoxie

Die Analyse der Ergebnisse des Western Blots (n=3) im Hinblick auf die Expression von HIF-1 α zeigte, dass bereits in unbehandelten CC531-Zellen HIF-1 α schwach exprimiert wird. Mit dem Einsatz höherer Irinotecankonzentrationen wird jeweils vermehrt HIF-1 α exprimiert.

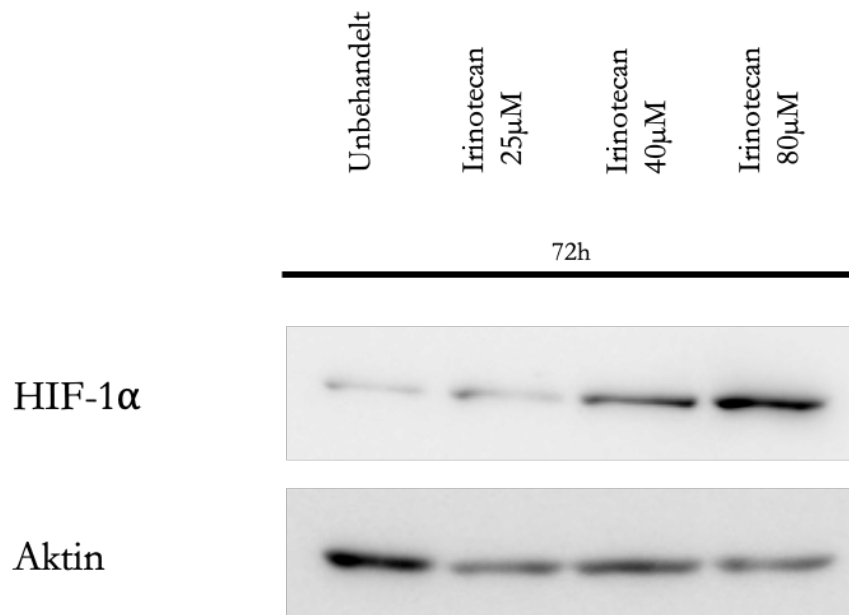


Abbildung 19: Analyse des Western Blots im Hinblick auf die Expression von HIF-1 α in CC531-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Irinotecan in unterschiedlichen Konzentrationen *in vitro*. Der Nachweis von Aktin diente der Proteinladekontrolle.

4.1.3 Apoptose

Alle Replikate (n=3) zeigten mit jeweils steigender Irinotecankonzentrationen eine steigende Expression von *cleaved* CASPASE-3. Die Zellen, die für 12 Stunden mit 1 μ M Staurosporin behandelt wurden, dienten als Positivkontrolle des Antikörpers.

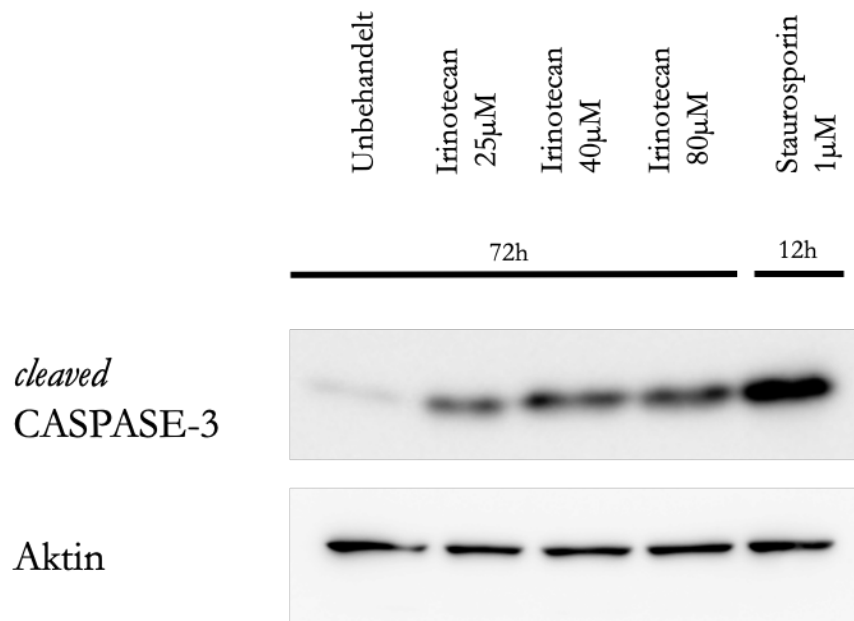


Abbildung 20: Expression von *cleaved* CASPASE-3 in CC531-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Irinotecan in unterschiedlichen Konzentrationen *in vitro*. Der Nachweis von Aktin diente der Proteinladekontrolle. Als Positivkontrolle für den Antikörper wurden CC531-Zellen für 12 h mit 1 μ M Staurosporin behandelt.

4.2 Tiermodell

Bei allen Tieren konnte die subkapsuläre Injektion der kolorektalen Rattentumorzellen CC531 regelrecht erfolgen. Bei drei Tieren war jedoch nach der Gewebeentnahme histologisch kein einzelner Tumor, sondern vielmehr ein disseminiertes Tumorstadium nachweisbar. Diese wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Alle anderen Versuchstiere entwickelten durchschnittlich ca. 6mm große, unifokale Tumoren. Die anschließende Wirkstoffapplikation via HAI oder als systemische Gabe erfolgte ohne technische Probleme. Die Wundheilung erfolgte jeweils *per primam*. Während der Studie zeigte kein Tier Veränderungen des Fressverhaltens oder sonstige Auffälligkeiten, die auf eine körperliche Beeinträchtigung auf dem Boden einer Tumormast hinwiesen.

4.3 Versuchsabschnitt II: Bestimmung der molekularen Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung

4.3.1 Irinotecan-Gruppe

4.3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mittels HE-Färbung wurde die Morphologie des Tumor- und des gesunden Lebergewebes beurteilt. Alle Tumoren zeigten typische histologische Eigenschaften des KRK. Das Tumorgewebe zeigte eine stark blaue basophile Färbung. Das gesunde Lebergewebe war dagegen stark azidophil (rot) gefärbt.

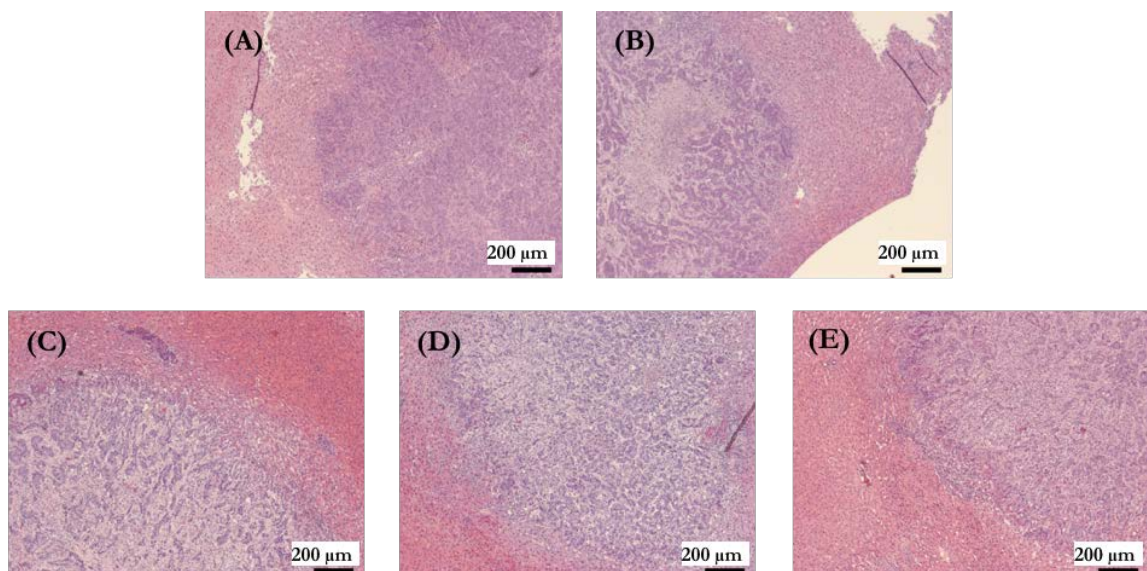


Abbildung 21: HE-Färbung des Tumor- und des angrenzenden Lebergewebes. Abbildung der (A) SHAM-, (B) SYS IRI-, (C) HAI IRI-, (D) HAI Embo + IRI-, (E) HAI Tandem + IRI-Gruppe in 50-facher Vergrößerung.

4.3.1.2 Immunhistochemische Färbung

Zur Beurteilung von Proliferation, Apoptose, DNA-Schäden und Hypoxie im CC531-Lebermetastasengewebe *in vivo* wurden die Formalin-fixierten Gewebeproben in Paraffin eingebettet und anschließend mit einem spezifischen Primärantikörpern mittels IHC detektiert (s. Kapitel 3.4.7.3).

4.3.1.2.1 Proliferation

Das Tumorgewebe zeigte eine hohe Anzahl PCNA-positiver Zellen. Zwischen den einzelnen Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

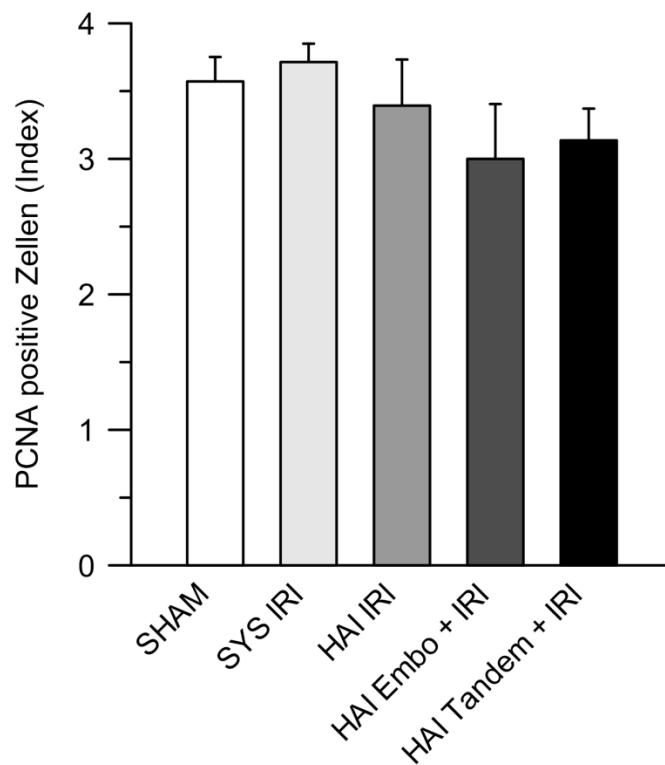


Abbildung 22: Analyse der PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF (Index). Index: 0: <1 %, 1: 1-10 %, 2: 10-30 %, 3: 30-50 %, 4: >50 %, PCNA-positive Zellen in %.

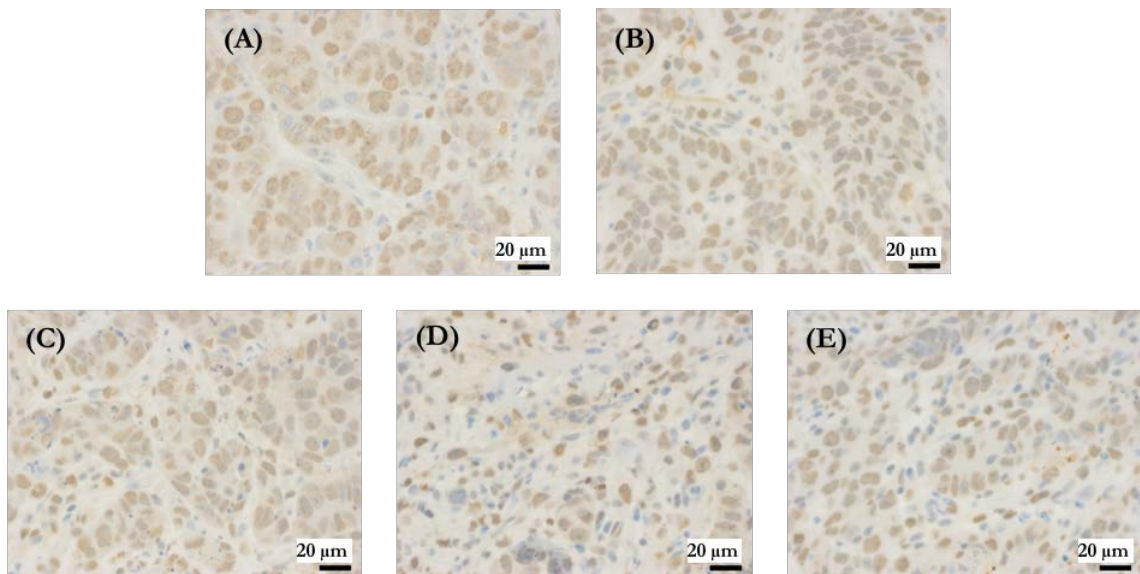


Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen PCNA. Abbildung des Tumorgewebes der (A) SHAM-, (B) SYS IRI-, (C) HAI IRI-, (D) HAI Embo + IRI-, (E) HAI Tandem + IRI-Gruppe in 400-facher Vergrößerung.

4.3.1.2.2 DNA-Schäden

Alle Behandlungsgruppen zeigten im Vergleich zur SHAM-Gruppe eine höhere Anzahl γ H2AX-positiver Zellen, insbesondere die HAI Embo + IRI-Gruppe. Auch zeigten die Gruppen, die mittels HAI behandelt wurden, eine erhöhte DNA-Schädigung im Vergleich zur SYS IRI-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht.

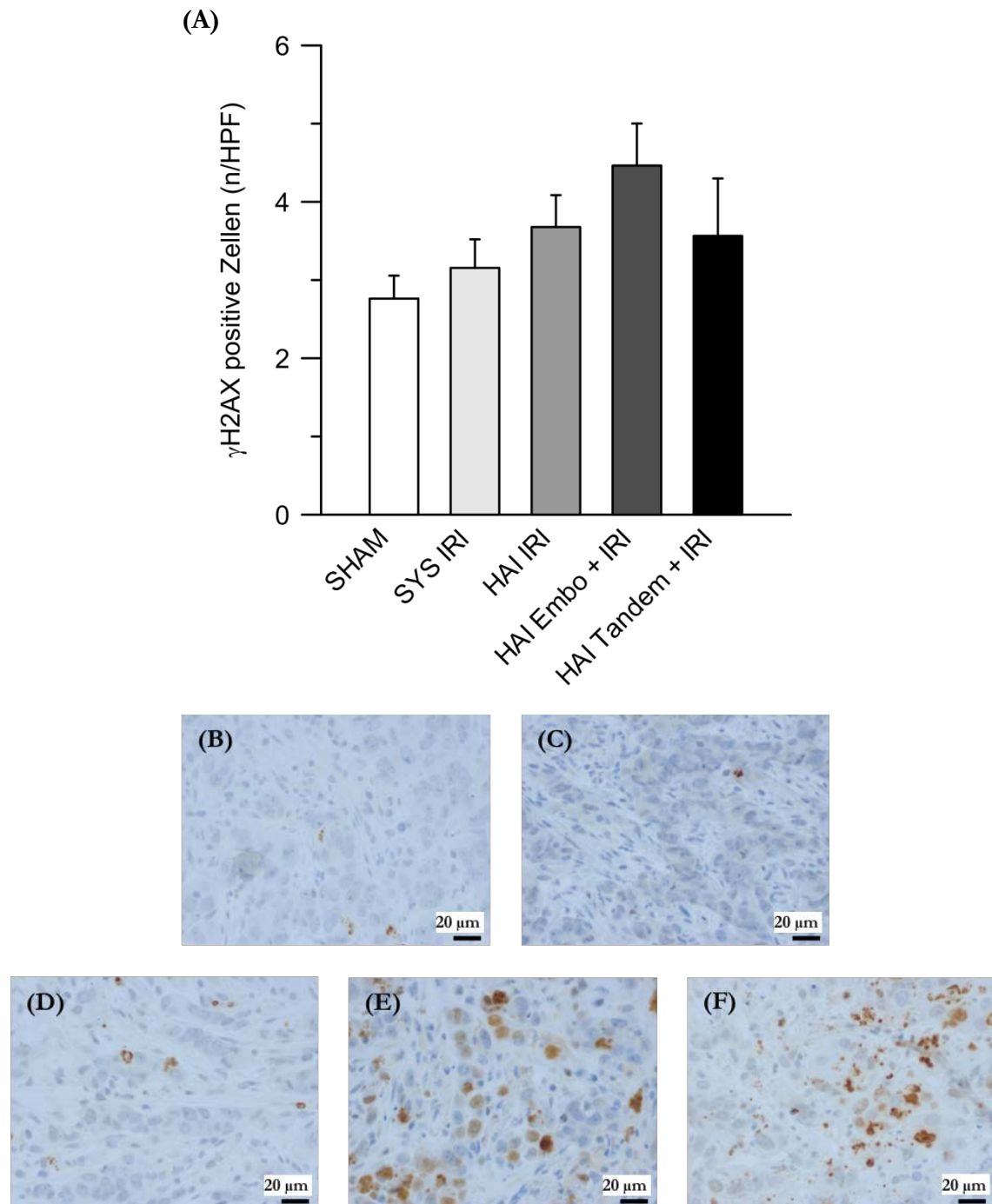


Abbildung 24: (A) Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe. (B)-(F): Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen γ H2AX. Abbildung des Tumorgewebes der (B) SHAM-, (C) SYS IRI-, (D) HAI IRI-, (E) HAI Embo + IRI-, (F) HAI Tandem + IRI-Gruppe in 400-facher Vergrößerung.

4.3.1.2.3 Hypoxie

In den Gruppen, die mittels HAI behandelt wurden, zeigte sich eine höhere Anzahl HIF-1 α -positiver Zellen als in der SHAM- und der SYS IRI-Gruppe. Die höchste Anzahl war in den Tieren der HAI Embo + IRI-Gruppe nachweisbar. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

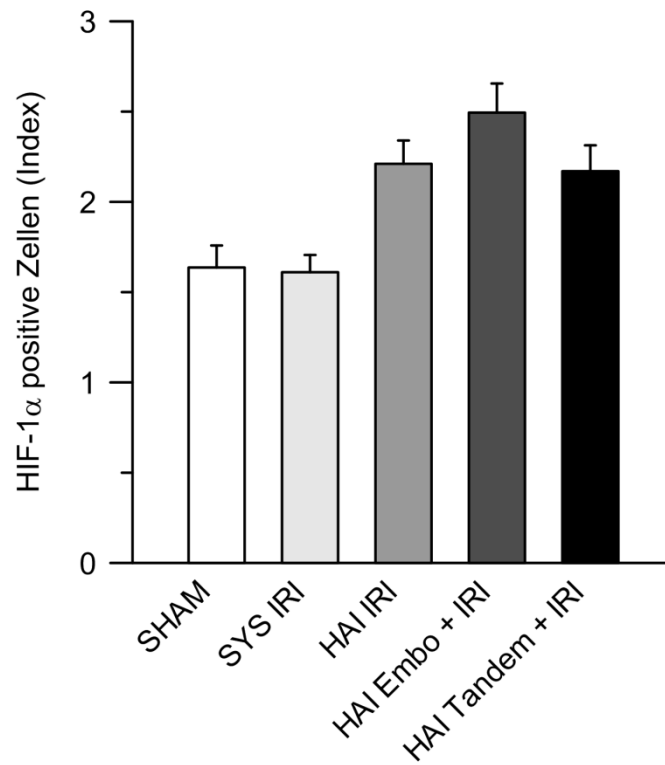


Abbildung 25: Analyse der HIF-1 α -positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF (Index).
Index: 0: 0 %, 1: 1-5 %, 2: 5-10 %, 3: 10-50 % 4: >50 % HIF-1 α -positive Zellen in %.

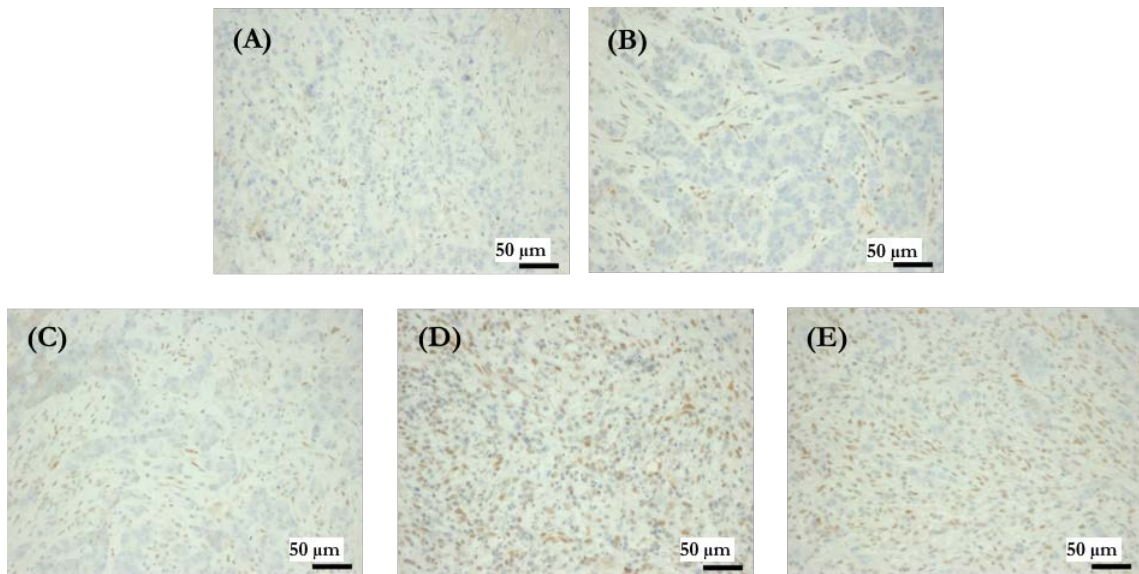


Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen HIF-1 α . Abbildung des Tumorgewebes der (A) SHAM-, (B) SYS IRI-, (C) HAI IRI-, (D) HAI Embo + IRI-, (E) HAI Tandem + IRI-Gruppe in 200-facher Vergrößerung.

4.3.1.2.4 Apoptose

Alle Behandlungsgruppen zeigten im Vergleich zur SHAM-Gruppe eine höhere Anzahl CASPASE-3-positiver Zellen. Der Unterschied der SYS IRI-, HAI Embo + IRI- und der HAI Tandem + IRI-Gruppe zur Kontrollgruppe war signifikant ($p=0,0346$, $p=0,0031$, $p=0,0093$). Auch zeigten die Gruppen, die mittels HAI behandelt wurden, eine erhöhte Anzahl CASPASE-3-positiver Zellen als die SYS IRI-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht.

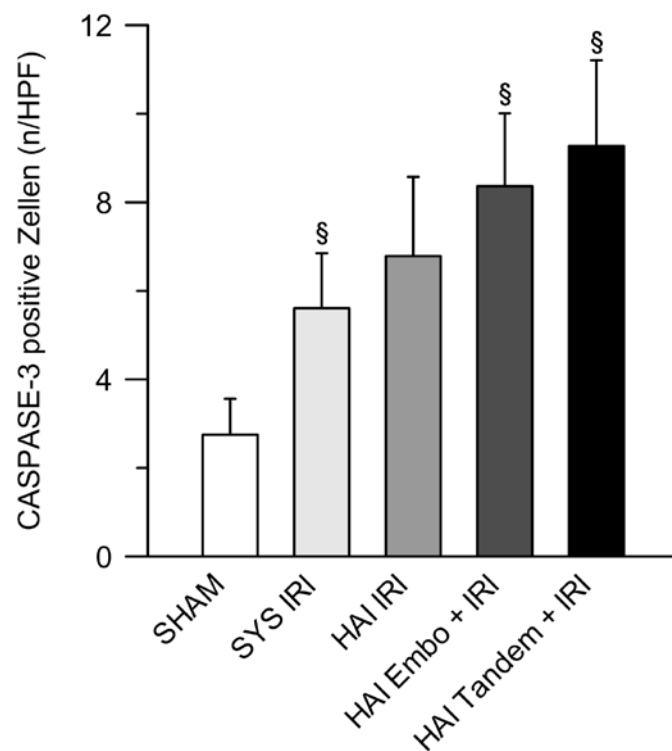


Abbildung 27: Anzahl der CASPASE-3-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe als Marker für Apoptose. § $p < 0,05$ im Vergleich zur SHAM-Gruppe

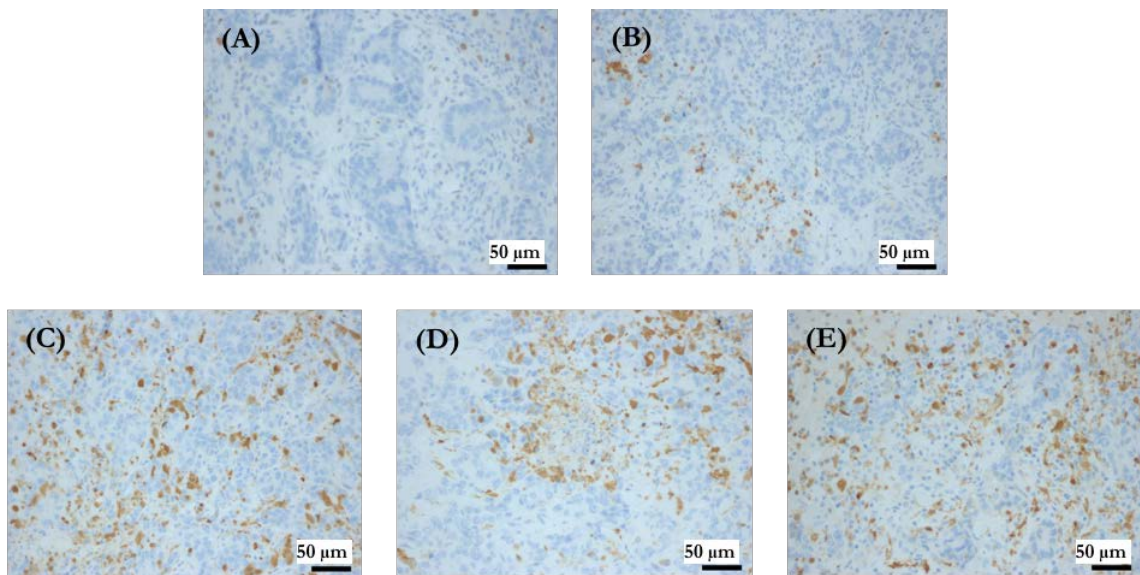


Abbildung 28: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen CASPASE-3. Abbildung des Tumorgewebes der (A) SHAM-, (B) SYS IRI-, (C) HAI IRI-, (D) HAI Embo + IRI-, (E) HAI Tandem + IRI-Gruppe in 200-facher Vergrößerung.

4.3.2 Onivyde®-Gruppe

4.3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mittels HE-Färbung wurde die Morphologie des gesunden Leber- und des Tumorgewebes beurteilt. Alle Tumoren zeigten typische histologische Eigenschaften des KRK. Das Tumorgewebe zeigte eine stark blaue, basophile Färbung. Das gesunde Lebergewebe war dagegen stark azidophil (rot) gefärbt.

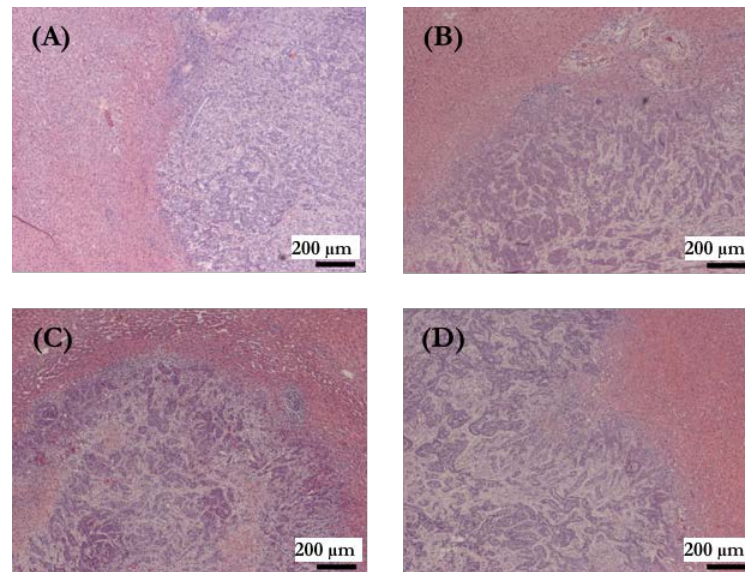


Abbildung 29: HE-Färbung des Tumor- und des angrenzenden Lebergewebes. Abbildung der (A) SHAM-, (B) SYS nal IRI-, (C) HAI nal IRI-, (D) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 50-facher Vergrößerung.

4.3.2.2 Immunhistochemische Färbung

4.3.2.2.1 Proliferation

Das Tumorgewebe zeigte eine hohe Anzahl PCNA-positiver Zellen. Zwischen den einzelnen Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

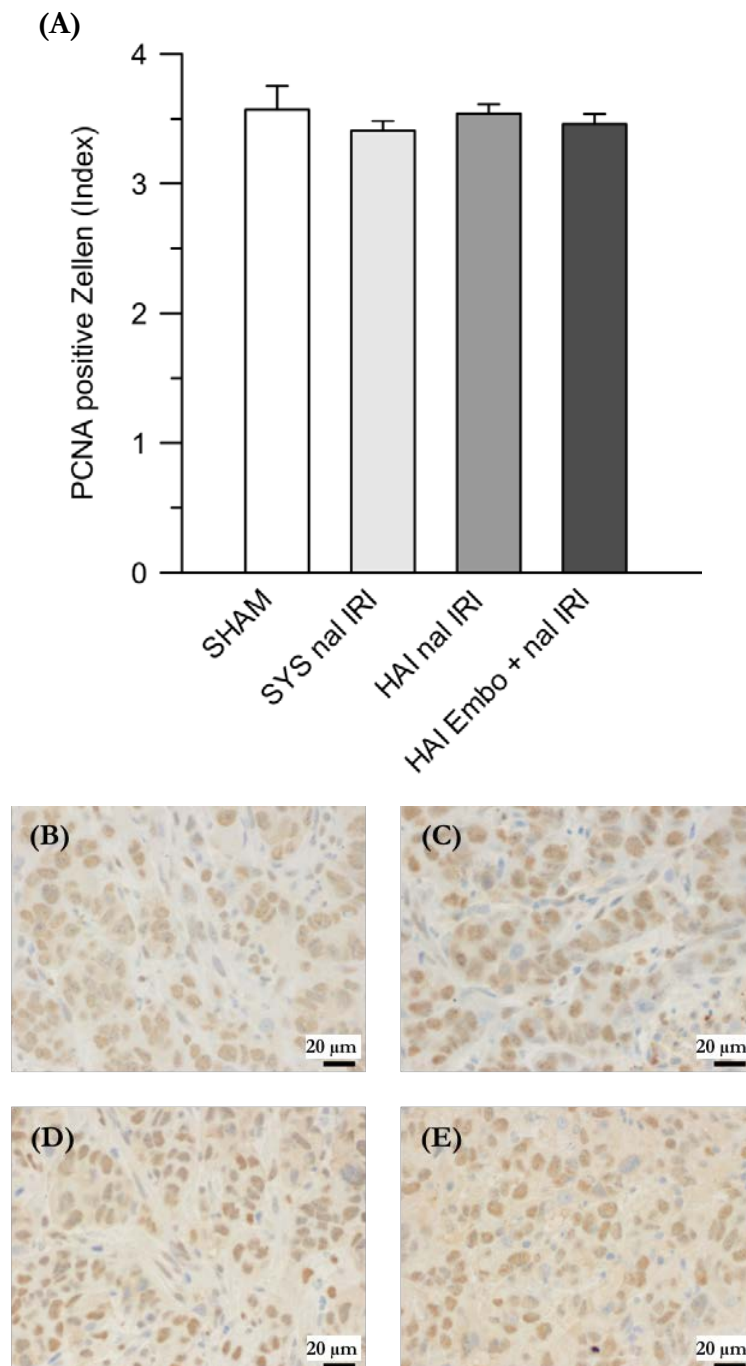


Abbildung 30: (A) Analyse der PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF (Index). (B)-(E): Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen PCNA. Abbildung des Tumorgewebes der (B) SHAM-, (C) SYS nal IRI-, (D) HAI nal IRI-, (E) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 400-facher Vergrößerung. Index: 0: <1 %, 1: 1-10 %, 2: 10-30 %, 3: 30-50 %, 4: >50 %, PCNA-positive Zellen in %.

4.3.2.2.2 DNA-Schäden

Alle Behandlungsgruppen zeigten im Vergleich zur SHAM-Gruppe eine höhere Anzahl γ H2AX-positiver Zellen, insbesondere die HAI nal IRI-Gruppe. Auch zeigten die Gruppen, die mittels HAI behandelt wurden, eine erhöhte DNA-Schädigung im Vergleich zur SYS nal IRI-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht.

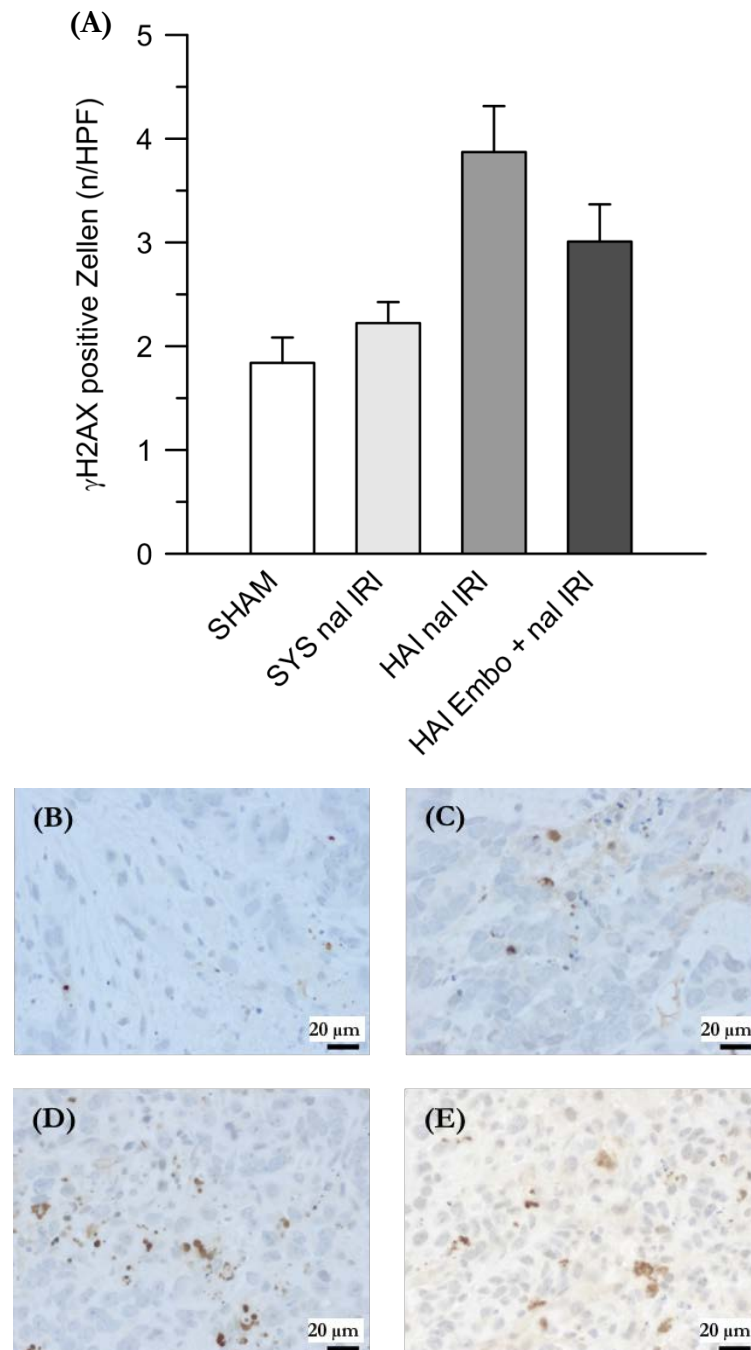


Abbildung 31: (A) Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe. (B)-(E): Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen γ H2AX. Abbildung des Tumorgewebes der (B) SHAM-, (C) SYS nal IRI-, (D) HAI nal IRI-, (E) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 400-facher Vergrößerung.

4.3.2.2.3 Hypoxie

In den mit Onivyde® behandelten Gruppen war eine höhere Anzahl HIF-1 α -positiver Zellen als in der SHAM-Gruppe nachweisbar. Der Unterschied zwischen der SYS nal IRI-Gruppe und der SHAM-Gruppe war signifikant ($p=0,0471$). Unter den behandelten Gruppen zeigte die SYS nal IRI-Gruppe die höchste Anzahl, dagegen die HAI Embo + nal IRI-Gruppe die niedrigste Anzahl HIF-1 α -positiver Zellen.

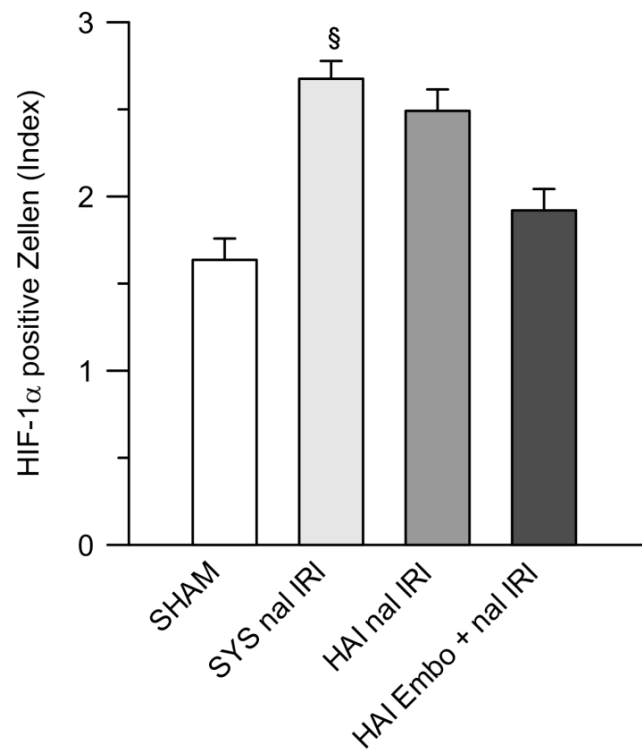


Abbildung 32: Analyse der HIF-1 α -positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF (Index). Index: 0: 0 %, 1: 1-5 %, 2: 5-10 %, 3: 10-50 % 4: >50 % HIF-1 α -positive Zellen in %. § $p<0,05$ im Vergleich zur SHAM-Gruppe.

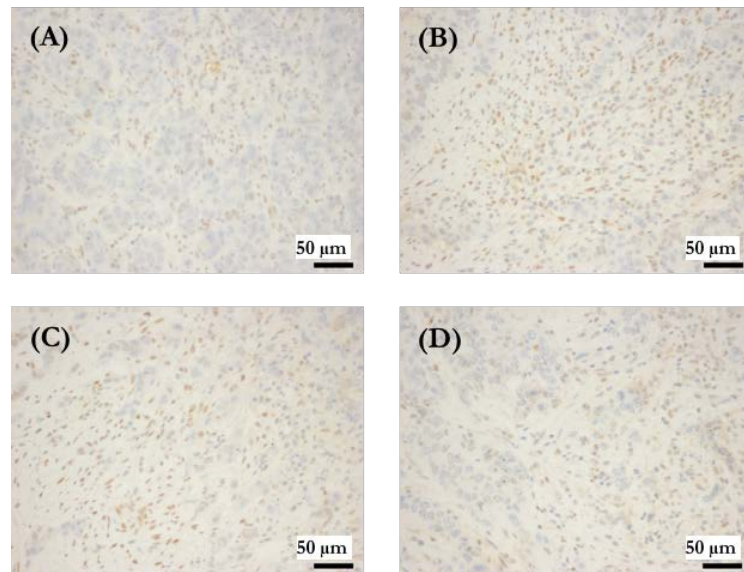


Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen HIF-1 α . Abbildung des Tumorgewebes der (A) SHAM-, (B) SYS nal IRI-, (C) HAI nal IRI-, (D) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 200-facher Vergrößerung.

4.3.2.2.4 Apoptose

Alle Behandlungsgruppen zeigten im Vergleich zur SHAM-Gruppe eine höhere Anzahl CASPASE-3-positiver Zellen. Der Unterschied der HAI nal IRI- und der HAI Embo + nal IRI-Gruppe zur Kontrollgruppe war signifikant ($p=0,0026$, $p=0,0014$). Auch war im Vergleich zur SYS nal IRI-Gruppe die Expression von CASPASE-3 in der HAI Embo + nal IRI-Gruppe signifikant höher ($p=0,0429$).

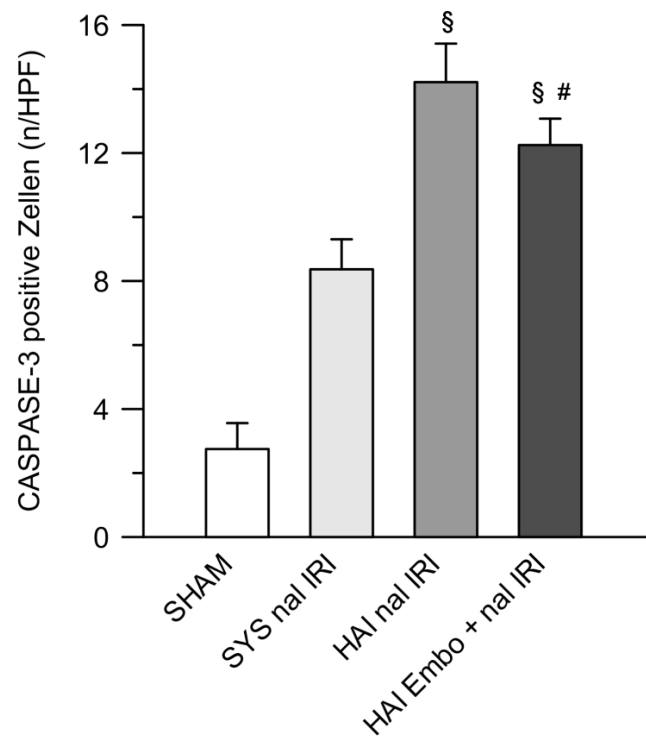


Abbildung 34: Anzahl der CASPASE-3-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe als Marker für Apoptose. § $p<0,05$ im Vergleich zur SHAM-Gruppe, # $p<0,05$ im Vergleich zur SYS nal IRI- Gruppe.

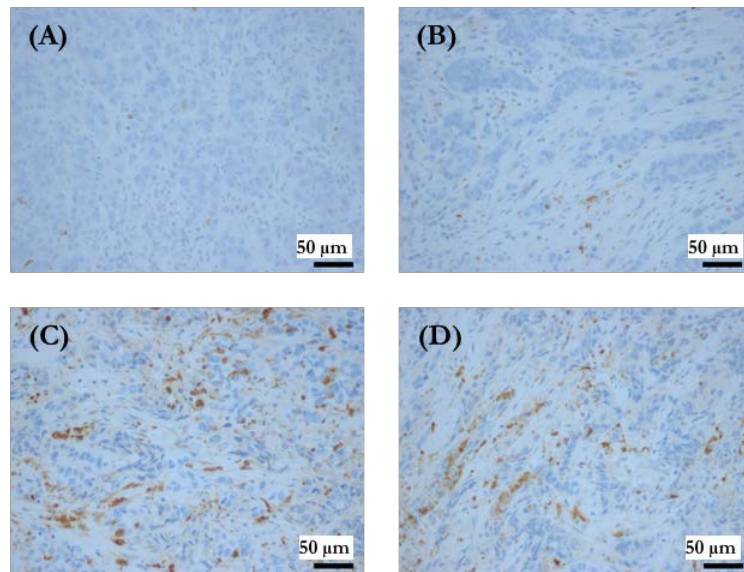


Abbildung 35: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen CASPASE-3. Abbildung des Tumorgewebes der (A) SHAM-, (C) SYS nal IRI-, (D) HAI nal IRI-, (E) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 200-facher Vergrößerung.

4.4 Versuchsabschnitt III: Bestimmung des Tumoransprechens

4.4.1 Tumolvolumenbestimmung

Das Tumolvolumen der SHAM-Gruppe stieg von Tag 10 auf 13 im Mittel um 76,76 %, in der HAI Embo-Gruppe hingegen nur um 11,26 %. In der HAI Embo + nal IRI-Gruppe (-28,21 %) und der HAI nal IRI-Gruppe (-23,7 %) war eine Reduktion des Tumolvolumens zu beobachten. Der Unterschied im Tumorwachstum zwischen der HAI nal IRI-, der HAI Embo- und der HAI Embo + nal IRI-Gruppe zur SHAM-Gruppe war jeweils signifikant ($p=0,015194$, $p=0,035201$, $p=0,004938$). Der Unterschied zwischen der HAI Embo + nal IRI-Gruppe und der HAI Embo-Gruppe war ebenfalls signifikant ($p=0,0268$).

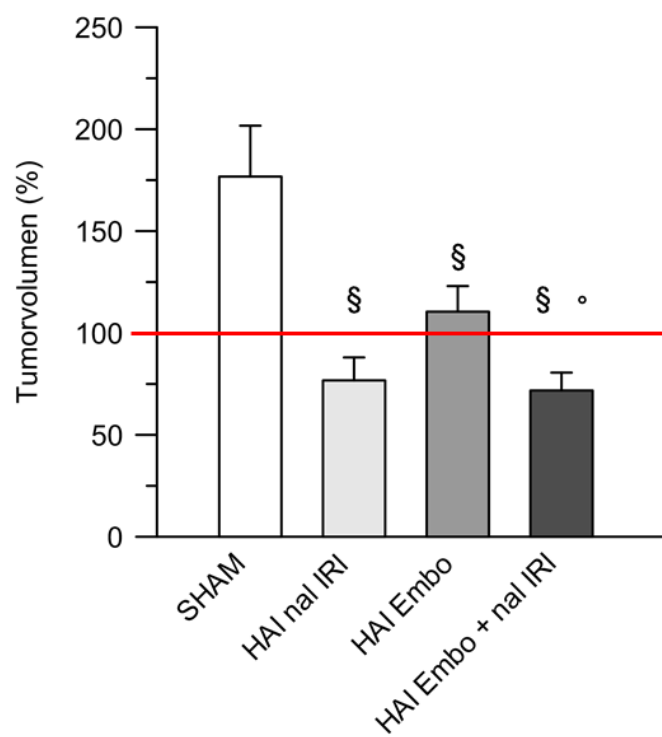


Abbildung 36: Prozentuale Veränderung des Tumolvolumens von Tag 10 zu Tag 13. Der Ausgangswert (100 %) wurde an Tag 10 nach der Tumorimplantation vor der Behandlung ermittelt. § $p<0,05$ im Vergleich zur SHAM-Gruppe, ° $p<0,05$ im Vergleich zur HAI Embo-Gruppe.

4.4.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

In allen HE-Schnitten der Tiere des Versuchsabschnitts III: Bestimmung des Tumoransprechens waren histologische Korrelate des KRK nachweisbar. Viele Tumoren wiesen eine ausgeprägte zentrale Nekrose auf. Analysiert wurde nur das proliferierende, nicht-nekrotische Tumorgewebe. Das Tumorgewebe zeigte eine stark blaue, basophile Färbung. Das gesunde Lebergewebe war dagegen stark azidophil (rot) gefärbt.

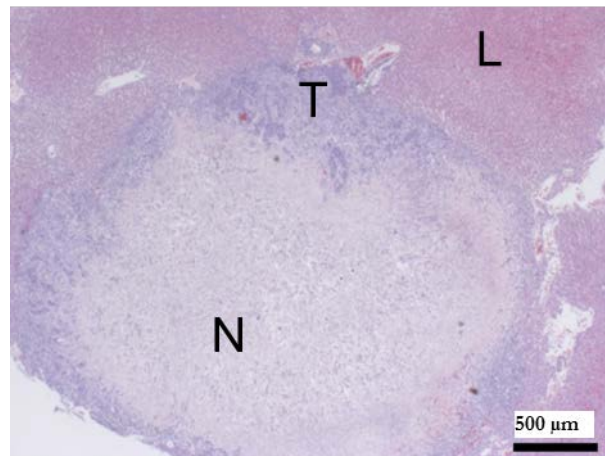


Abbildung 37: HE-Färbung eines Tumors (T) mit zentraler Nekrose (N) und angrenzendem Lebergewebe (L) in 25-facher Vergrößerung

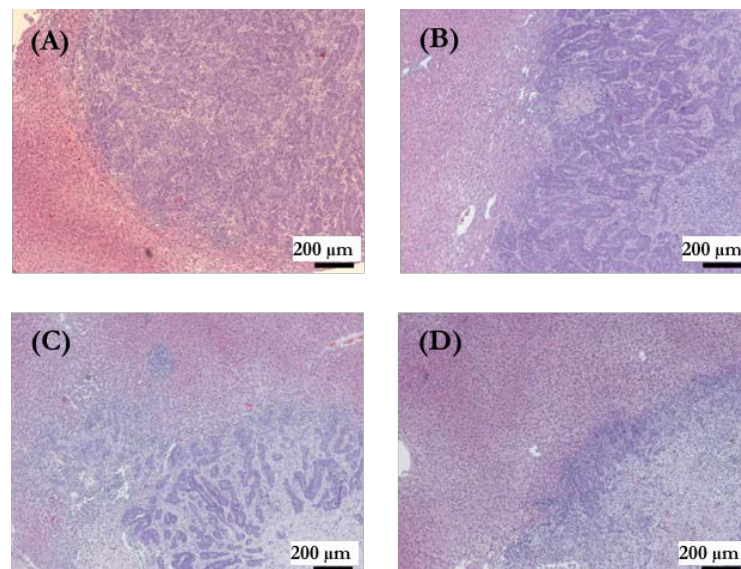


Abbildung 38: HE-Färbung des Tumor- und des angrenzenden Lebergewebes. Abbildung des Tumorgewebes der (A) SHAM-, (B) HAI nal IRI-, (C) HAI Embo-, (D) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 50-facher Vergrößerung.

4.4.1.2 Zellschädigung

Es zeigten sich keine Unterschiede im Vakuolisierungsgrad und der Grobscholligkeit des Zytoplasmas zwischen den Gruppen.

Eine leicht erhöhte Anzahl an Zelldeformationen war in den behandelten Gruppen im Vergleich zur SHAM-Gruppe ohne signifikanten Unterschied nachweisbar.

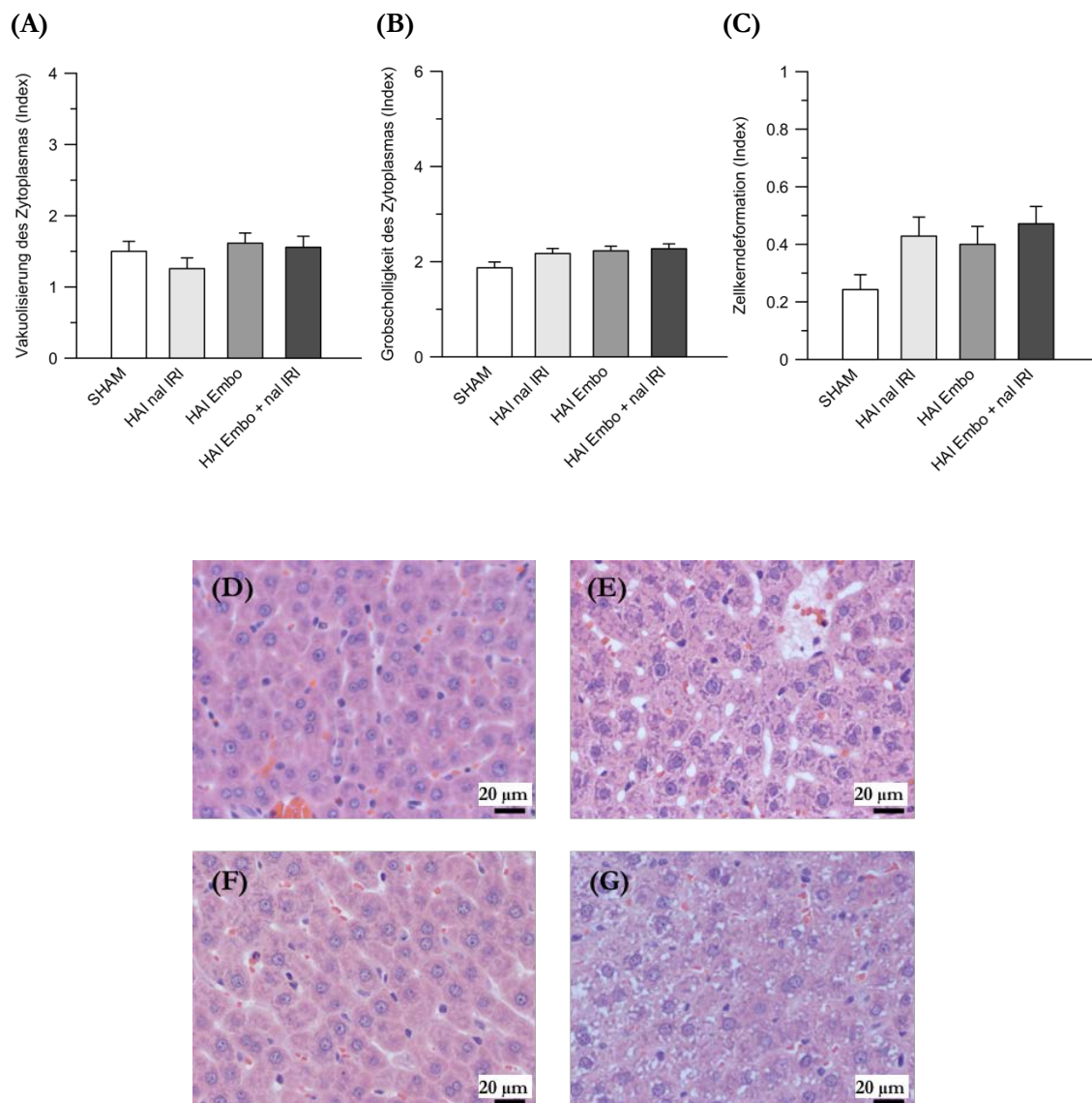


Abbildung 39: Analyse der Hepatozytenschädigung in Hinblick auf Vakuolisierung (A), Grobscholligkeit des Zytoplasmas (B) und Zellkerndeformationen (C) als Index dargestellt. (D) Abbildung einer Grad 0 Grobscholligkeit, Tier der Gruppe HAI Embo; (E) Abbildung einer Grad 3 Grobscholligkeit, Tier der Gruppe HAI Embo. (F) Abbildung einer Grad 0 Vakuolisierung, Tier der Gruppe HAI nal IRI; (G) Abbildung einer Grad 3 Vakuolisierung, Tier der Gruppe HAI Embo + nal IRI. Index: 0: 0 %, 1: <30 %, 2: 40-70 %, 3: >70 % der Hepatozyten zeigten das Merkmal, in %. HE-Färbung in 400-facher Vergrößerung.

4.4.2 Immunhistochemische Färbung

4.4.2.1 Proliferation

Das Tumorgewebe zeigte eine hohe Anzahl PCNA-positiver Zellen. Zwischen den einzelnen Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

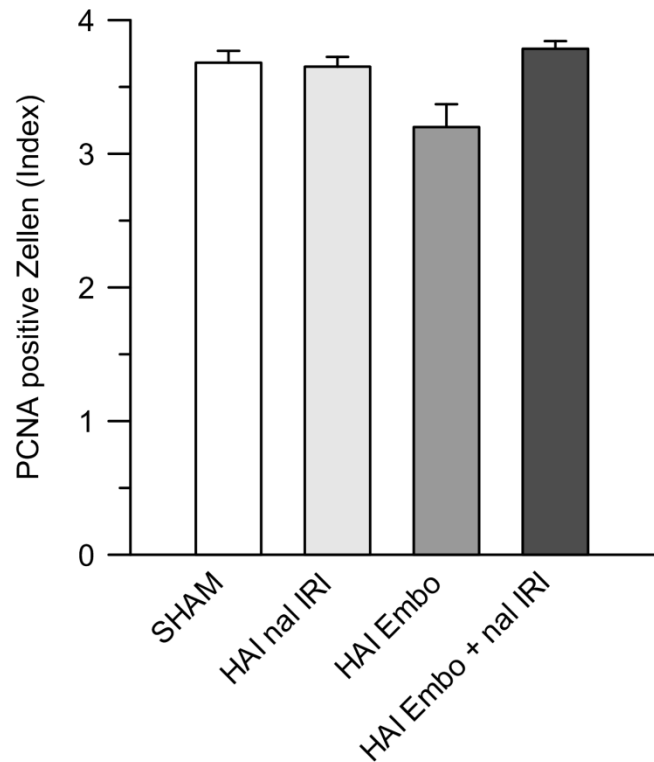


Abbildung 40: Analyse der PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF (Index). Index: 0: <1 %, 1: 1-10 %, 2: 10-30 %, 3: 30-50 %, 4: >50 %, PCNA-positive Zellen in %.

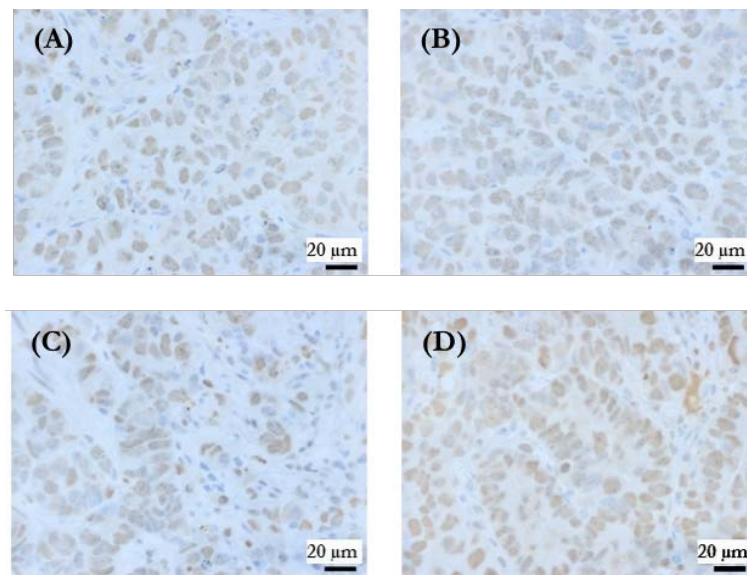


Abbildung 41: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen PCNA. Abbildung des Tumorgewebes der (A) SHAM-, (B) HAI nal IRI-, (C) HAI Embo-, (D) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 400-facher Vergrößerung.

4.4.2.2 DNA-Schäden

Die Gruppen, die mit Onivyde® behandelt wurden, zeigten eine erhöhte Anzahl γ H2AX-positiver Zellen im Vergleich zur SHAM- und HAI Embo-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht.

Im gesunden Lebergewebe waren keine γ H2AX-positiven Zellen nachweisbar.

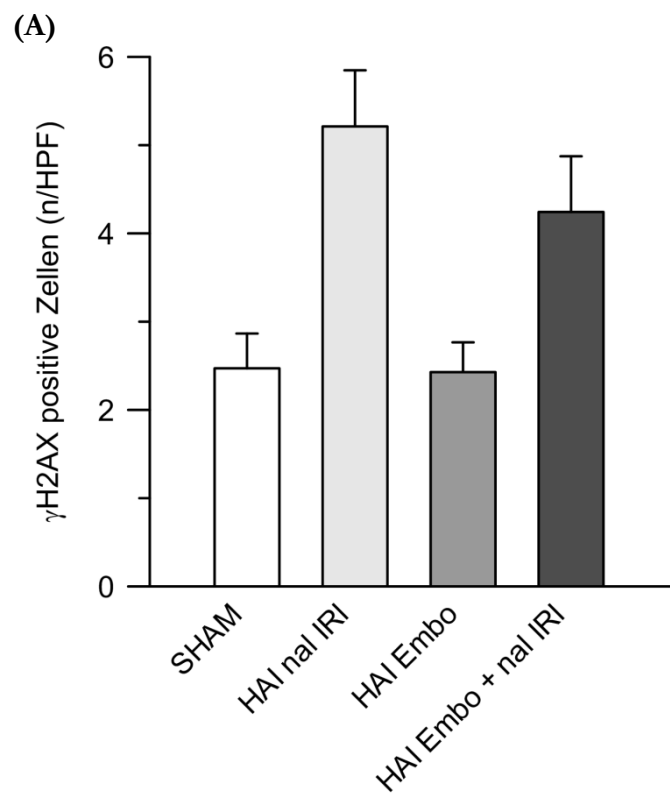


Abbildung 42: Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe

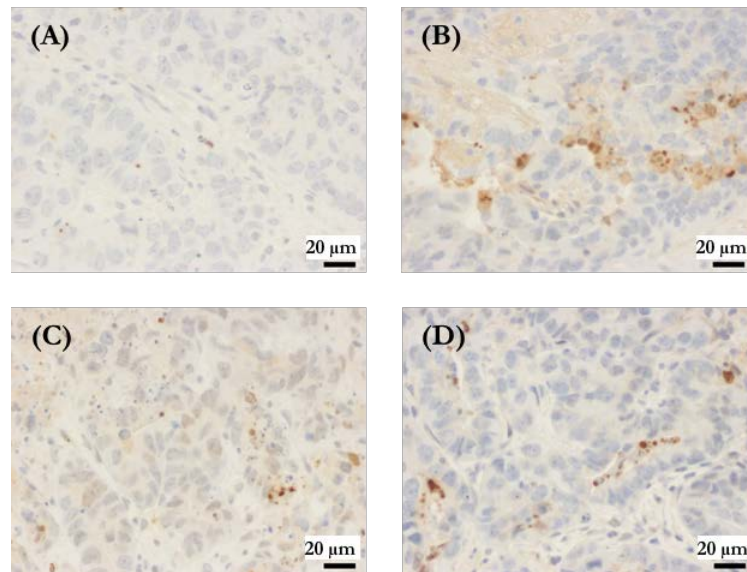


Abbildung 43: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen γ H2AX. Abbildung des Tumorgewebes der (A) SHAM-, (B) HAI nal IRI-, (C) HAI Embo-, (D) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 400-facher Vergrößerung.

4.4.2.3 Hypoxie

In den behandelten Gruppen war eine höhere Anzahl HIF-1 α -positiver Zellen als in der SHAM-Gruppe nachweisbar. Der Unterschied zwischen der HAI Embo-Gruppe und der SHAM-Gruppe war signifikant ($p=0,0409$).

Im gesunden Lebergewebe war kein Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar.

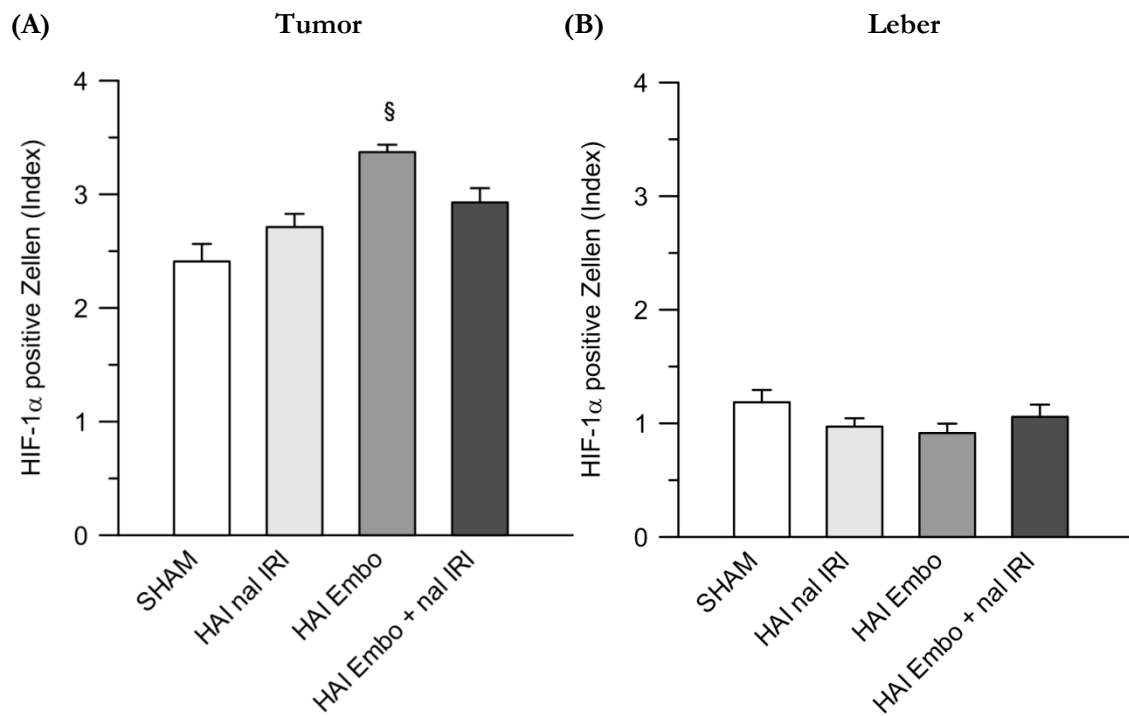


Abbildung 44: (A) Analyse der HIF-1 α -positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF (Index). (B) Analyse der HIF-1 α -positiven Zellen im gesunden Lebergewebe pro HPF (Index). Index: 0: 0 %, 1: 1-5 %, 2: 5-10 %, 3: 10-50 % 4: >50 % HIF-1 α -positive Zellen in %. § $p<0,05$ im Vergleich zur SHAM-Gruppe.

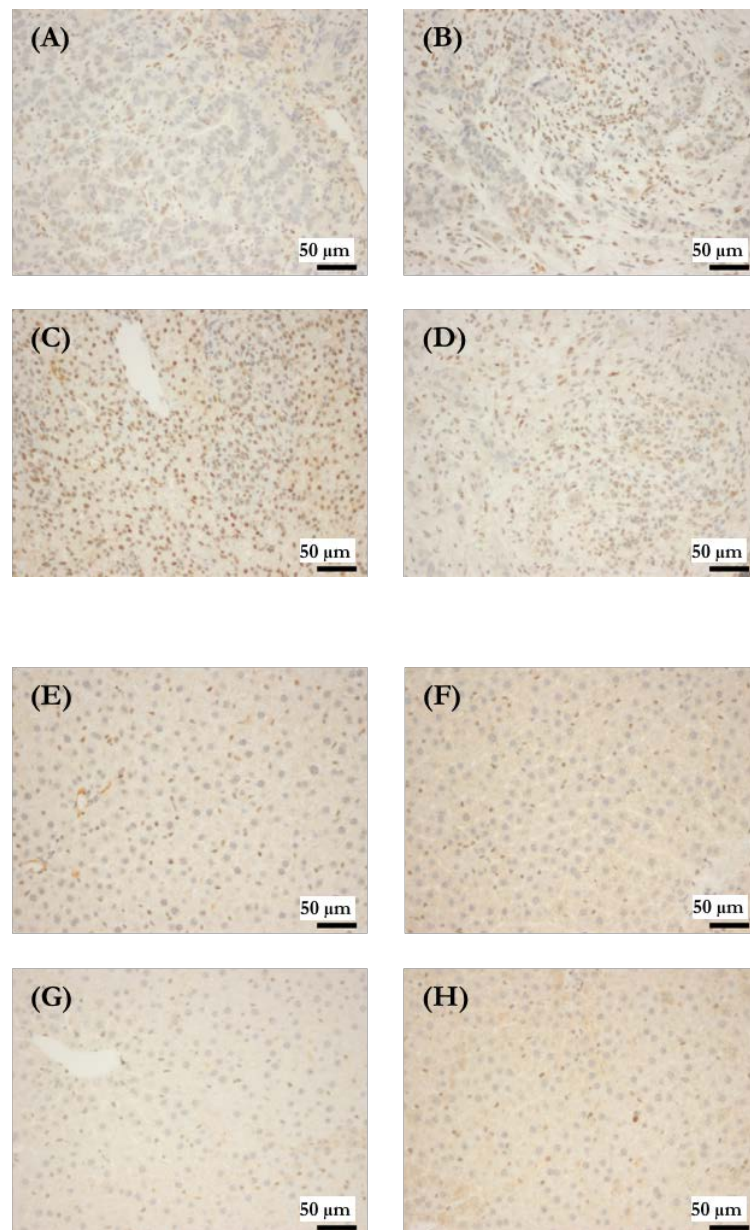


Abbildung 45: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen HIF-1 α . Abbildung des Tumorgewebes der (A) SHAM-, (B) HAI nal IRI-, (C) HAI Embo-, (D) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 200-facher Vergrößerung. Abbildung des Lebergewebes der (E) SHAM-, (F) HAI nal IRI-, (G) HAI Embo-, (H) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 200-facher Vergrößerung.

4.4.2.4 Angiogenese

In den behandelten Gruppen waren im Tumorgewebe mehr PECAM-1-positive Gefäße pro HPF im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne signifikante Unterschiede nachweisbar.

Im gesunden Lebergewebe waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar.

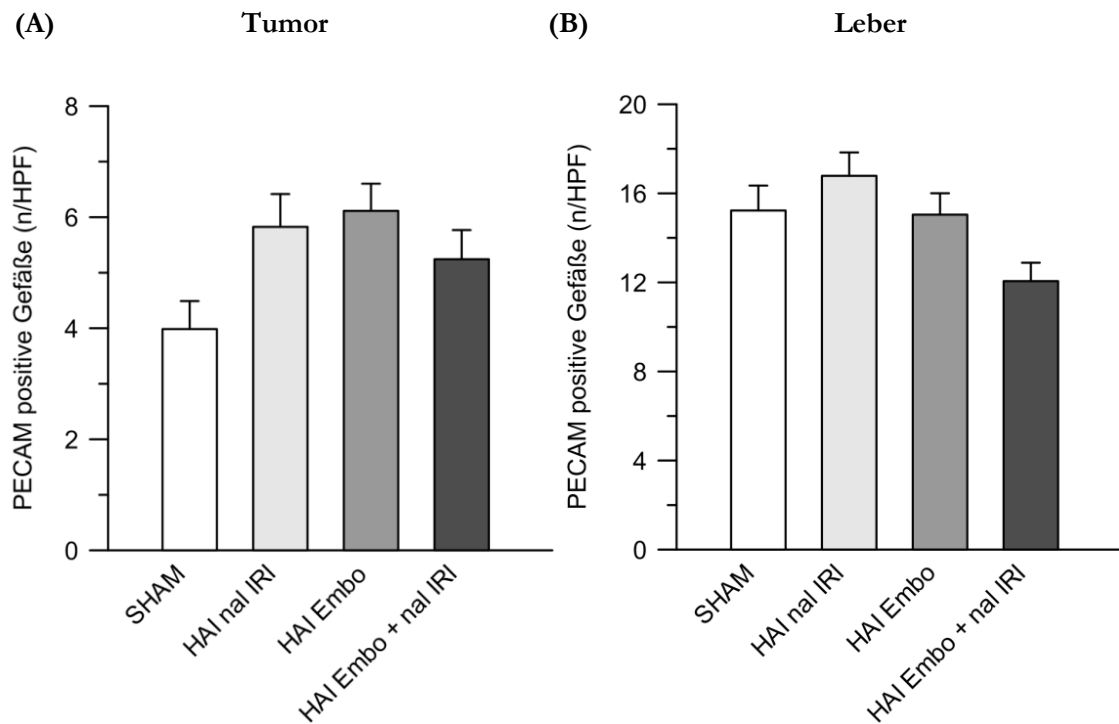


Abbildung 46: (A) Anzahl der PECAM-1-positiven Gefäße pro HPF des Tumorgewebes. (B) Anzahl der PECAM-1-positiven Gefäße pro HPF des gesunden Lebergewebes.

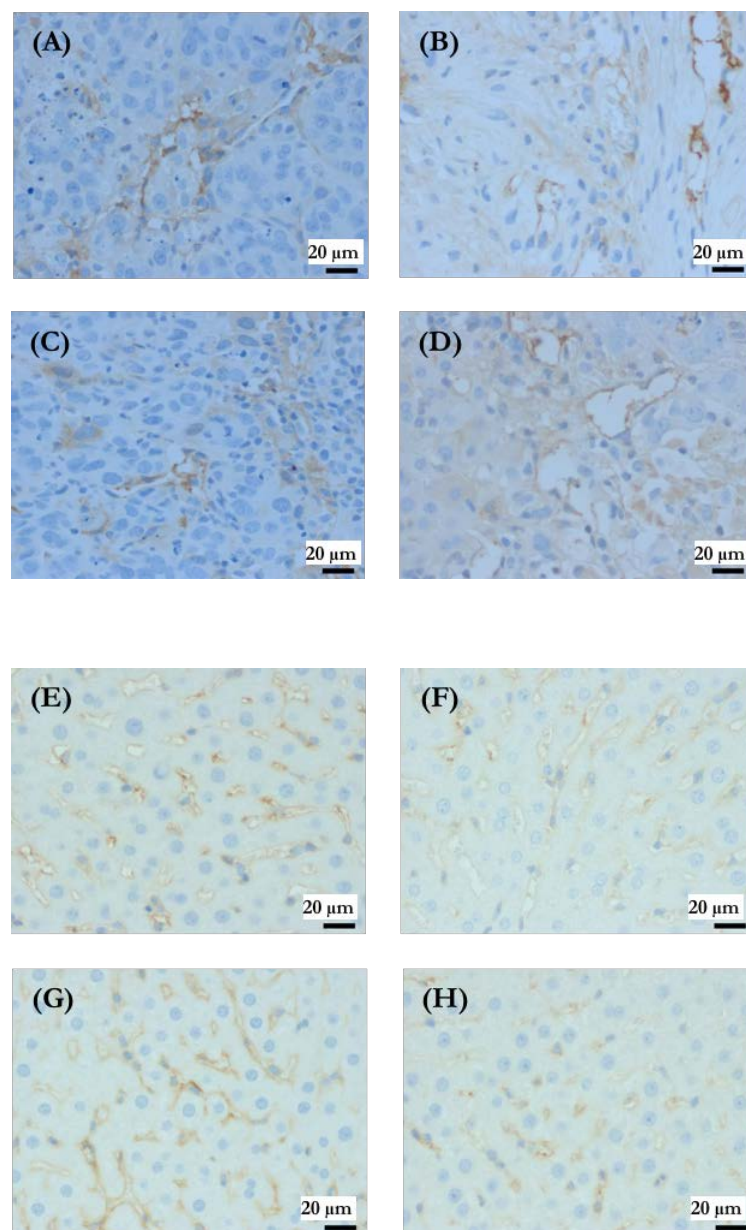


Abbildung 47: Immunhistochemische Färbung der Gefäße mit dem Antikörper gegen PECAM-1. Abbildung des Tumorgewebes der (A) SHAM-, (B) HAI nal IRI-, (C) HAI Embo-, (D) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 400-facher Vergrößerung. Abbildung des Lebergewebes der (E) SHAM-, (F) HAI nal IRI-, (G) HAI Embo-, (H) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 400-facher Vergrößerung.

4.4.2.5 Apoptose

Alle Behandlungsgruppen zeigten im Vergleich zur SHAM-Gruppe eine höhere Anzahl CASPASE-3-positiver Zellen. Die Gruppen, die mit Onivyde® behandelt wurden, zeigten eine erhöhte Anzahl CASPASE-3-positiver Zellen im Vergleich zur SHAM- und HAI Embo-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied war zwischen der HAI Embo + nal IRI- und der SHAM-Gruppe nachweisbar ($p=0,0442$).

Im gesunden Lebergewebe waren keine CASPASE-3 positiven Zellen nachweisbar.

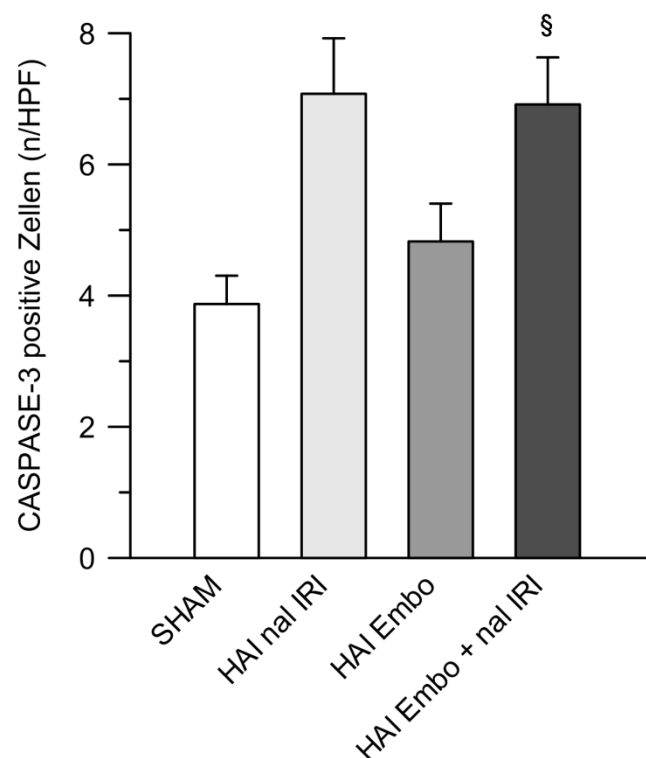


Abbildung 48: Anzahl der CASPASE-3-positiven Zellen pro HPF im Tumorgewebe als Marker für Apoptose. § $p < 0,05$ im Vergleich zur SHAM-Gruppe.

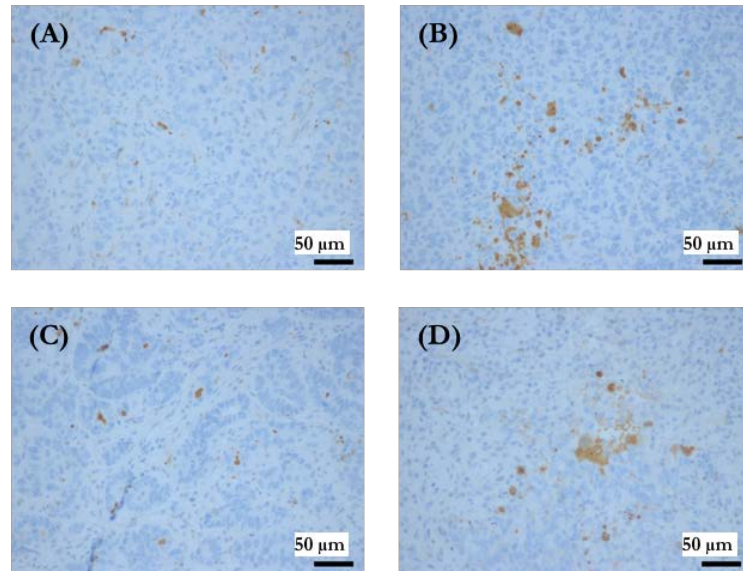


Abbildung 49: Immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes mit dem Antikörper gegen CASPASE-3. Abbildung des Tumorgewebes der (A) SHAM-, (B) HAI nal IRI-, (C) HAI Embo-, (D) HAI Embo + nal IRI-Gruppe in 200-facher Vergrößerung.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten im Versuchsabschnitt I „*In-vitro*-Versuche“ deutliche molekulare Veränderungen der CC531-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit Irinotecan nachgewiesen werden. Hervorzuheben ist die erhöhte Expression des Apoptose- sowie Proliferationsmarkers. Im zweiten Versuchsabschnitt „Bestimmung molekularer Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung“ konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Irinotecan und EmboCept® S als HAI mehr molekulare Veränderungen im Vergleich zur alleinigen HAI mit Irinotecan verursacht. Zudem ist die HAI mit Onivyde® der systemischen Applikation in Bezug auf diese Veränderungen überlegen. Im dritten Versuchsabschnitt „Bestimmung des Tumoransprechens“ war eine gute antitumoröse Wirkung der HAI mit Onivyde® sowohl im Hinblick auf molekulare Veränderungen als auch auf eine Tumolvolumenreduktion 72 Stunden nach der Behandlung nachweisbar.

5.1 Material und Methoden

Die in der IHC verwendeten Antikörper sowie die Auswertungsschemata wurden erstmals im Rahmen dieser Dissertation in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen etabliert.

Das CC531-KRLM-Modell in WAG/Rij-Ratten stellt ein etabliertes orthotopes, präklinisches Modell zur Beurteilung neuer Therapieverfahren, insbesondere der HAI, für KRLM dar (Sperling et al. 2012; Saenger et al. 2004; Eyol et al. 2008). Auch die IHC mit den Antikörpern gegen CASPASE-3, PCNA und PECAM-1 sind in vorherigen Studien als geeigneter Nachweis für Apoptose, Proliferation und Angiogenese in diesem Modell beschrieben worden (Sperling et al. 2012). Dagegen wurde die IHC mit den Antikörpern gegen γ H2AX und HIF-1 α erstmals für das CC531-KRLM-Modell in der vorliegenden Dissertation untersucht.

Das Histonprotein γ H2AX spielt eine wichtige Rolle als Stabilisator und Katalysator im Reparaturmechanismus von DNA-Doppelstrangbrüchen. γ H2AX-negative Mäuse wiesen eine erhöhte Radiosensitivität und Inzidenz für veränderte Mitose auf (Mah et al. 2010). Der Antikörper gegen γ H2AX wurde erfolgreich als Immunfluoreszenzmarker für DNA-Doppelstrangbrüche sowohl nach Radio- als auch nach Chemotherapie beschrieben (Mah et al. 2010). Im Zusammenhang mit der Therapie mit Topoisomerase I-Inhibitoren zeigten Huang X et al. (2003), dass die Phosphorylierung von H2AX zu γ H2AX in Verbindung mit induzierten Doppelstrangbrüchen und nicht mit Apoptose-assoziierten Schäden steht. Daher ist es zur Beurteilung von Irinotecan-induzierten Schäden gut geeignet (Huang X et al. 2003). Auch erwies sich γ H2AX als ein geeigneter Marker für DNA-Frühschäden in einer klinischen Studie bei Patienten mit einem KRK nach einer intraoperativen *heated*

intraperitoneal chemotherapy mit Mitomycin C (Wagner et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass γ H2AX auch noch 72 Stunden nach einer einmaligen Behandlung mit Irinotecan im Tumorgewebe nachgewiesen werden kann (s. Kapitel 4.4.2.2). Auch zeigte sich in den Behandlungsgruppen, die Onivyde® erhielten, eine deutlich vermehrte Phosphorylierung von H2AX zu γ H2AX, ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen.

HIF-1 α ist eine Untereinheit des Hypoxie-induzierten Transskriptionsfaktors 1. Dieser wird bei Anwesenheit von Sauerstoff hydroxyliert und durch das Proteasom abgebaut. Bei Hypoxie dagegen findet keine Hydroxylierung statt und HIF-1 α bindet an das *Hypoxia Response Element* der DNA. Dadurch wird u. a. die Angiogenese und Erythropoese stimuliert (Ioannou et al. 2015). Die IHC mit dem Antikörper gegen HIF-1 α stellt eine etablierte Methode zur qualitativen Analyse einer Hypoxie im Tumorgewebe dar. Allerdings konnte auch in unbehandeltem, humanen kolorektalem Tumorgewebe eine Überexpression von HIF-1 α nachgewiesen werden, während sich im gesunden Kolon- und Lebergewebe keine Expression von HIF-1 α (Zhong et al. 1999). Der Antikörper gegen HIF-1 α wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Absicht zur Identifikation von Therapie-induzierter Hypoxie, verursacht durch die Verwendung von Embolisatpartikeln, genutzt.

5.2 Versuchsabschnitt I: *In-vitro*-Versuche

Im hier beschriebenen *in-vitro*-Versuch wurde die Proteinexpression von CC531-Zellen unter Behandlung mit Irinotecan untersucht, um das Verhalten der Tumorzellen unter Therapie zu beurteilen. Nach der 72-stündigen Inkubation der CC531-Zellen mit jeweils aufsteigenden Irinotecankonzentrationen zeigte die Proteinanalyse mittels Western Blot eine gesteigerte Expression des Apoptosemarkers *cleaved* CASPASE-3. Die Expression des Hypoxiemarkers HIF-1 α nahm unter steigenden Irinotecankonzentrationen ebenfalls zu. Erstaunlicherweise war die Expression des Proliferationsmarkers PCNA unter der Behandlung mit Irinotecan im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch ebenfalls erhöht.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit bewiesen Huang Q et al. (2011) in einer *in-vitro*-Studie an humanen und murinen Brustkrebszellen, dass beim sog. *phoenix rising pathway* bestrahlte, apoptotische Zellen die wenigen, verbliebenen Zellen zur Proliferation anregten. Laut Huang Q et al. (2011) spielte dabei CASPASE-3 eine wichtige Rolle. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe dieses Phänomen auch in einem subkutanen Brustkrebsmodell in der Maus belegen (Huang Q et al. 2011). Zhang Z et al. (2015) untersuchten dieses Phänomen an verschiedenen humanen kolorektalen Karzinomzelllinien *in vitro* unter Radiotherapie. Auch sie wiesen eine Korrelation zwischen der Apoptose der bestrahlten Zellen und einer gesteigerten Proliferation der verbliebenen Zellen nach (Zhang Z et al. 2015). Die vorliegende Arbeit zeigte eine erhöhte Proliferationsrate der CC531-Zellen trotz einer zunehmenden Expression des Apoptosemarkers *cleaved* CASPASE-3 unter aufsteigenden Irinotecankonzentrationen *in vitro*. Dies deutet darauf hin, dass auch in kolorektalen Rattenkrebszellen unter Chemotherapie *in vitro* ein ähnlicher Mechanismus, analog zu dem von Huang Q et al. (2011) beschriebenen, besteht.

5.3 Versuchsabschnitt II: Bestimmung der molekularen Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung

In diesem Versuchsabschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen auf molekularer Ebene vier Stunden nach der Behandlung des CC531-KRLM-Gewebes *in vivo* mit verschiedenen Therapieschemata (s. Kapitel 3.4.6) analysiert. Im nächsten Schritt erfolgte der Vergleich mit den nachgewiesenen Konzentrationen von CPT-11 und seinem aktiven Metaboliten SN-38 im Plasma sowie im Tumor- und Lebergewebe. Die CPT-11- und SN-38-Konzentrationen wurden vier Stunden nach der Behandlung, entsprechend dem Protokoll (s. Kapitel 3.4.6), mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Martin Czejka, Abteilung für klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien, bestimmt (unveröffentlichte Daten).

5.3.1 Irinotecan-Gruppe

Irinotecan ist seit Jahren Bestandteil der First- und Secondline-Therapie des KRK. Allerdings weist Irinotecan neben seiner guten antitumorösen Wirkung ein relevantes Nebenwirkungsprofil auf (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014). Um dieses zu minimieren, wird seit Jahren an nebenwirkungsärmeren, lokoregionären Therapien, wie HAI und TACE, geforscht (Fiorentini et al. 2012). In diesem Versuchsabschnitt wurden erstmalig die molekularen Veränderungen in Korrelation zu den nachgewiesenen CPT-11- und SN-38-Konzentrationen nach HAI mit Irinotecan in Kombination mit verschiedenen Embolisatpartikeln untersucht.

In der IHC-Analyse waren bereits vier Stunden nach der Behandlung deutliche Veränderungen auf molekularer Ebene nachweisbar. Insbesondere nach der Applikation von EmboCept® S und Irinotecan via HAI zeigte sich eine vermehrte DNA-Schädigung sowie eine erhöhte Apoptoserate und Expression von HIF-1 α im Vergleich zur Kontrollgruppe und der systemischen Applikation von Irinotecan. Die nachgewiesenen, vermehrten molekularen Veränderungen nach HAI mit EmboCept® S und Irinotecan korrelierten mit einer signifikant erhöhten CPT-11- und SN-38-Konzentration im Tumorgewebe im Vergleich zur systemischen Applikation von Irinotecan. Gemessen an diesen Parametern zeigte sich, dass die HAI mit Irinotecan und EmboCept® S im Vergleich zur systemischen Applikation von Irinotecan im vorliegenden Modell effektiver ist.

Auch führte die HAI mit EmboCept® S und Irinotecan im Unterschied zur alleinigen HAI mit Irinotecan zu einer signifikant geringeren CPT-11-Konzentration im Plasma. Dies bestätigt die Ansicht von Lindell et al. (1978), dass die zusätzliche Applikation von Embolisatpartikeln zu einem Abflussstau des Zytostatikums im Tumorgewebe führt und somit zu einer geringeren systemischen Konzentration des Zytostatikums. Folglich könnten durch die geringere systemische CPT-11-Konzentration mögliche, systemische

Nebenwirkungen minimiert werden, da diese vor allem durch die lokale Umwandlung von CPT-11 in SN-38 im Ileum und Jejunum entstehen (Guichard et al. 1999).

Im Vergleich zur alleinigen HAI mit Irinotecan verursachte die HAI mit EmboCept® S und Irinotecan deutlich vermehrte molekulare Veränderungen in Hinblick auf Apoptose, DNA-Schädigung und Expression von HIF-1 α . Zudem war eine signifikant erhöhte SN-38-Konzentration im Tumorgewebe nach HAI mit EmboCept® S und Irinotecan im Vergleich zu den Tieren nach HAI mit Irinotecan nachweisbar. Daraus lässt sich auf eine Anreicherung des Zytostatikums und eine somit gesteigerte lokale Wirkung durch die zusätzliche Applikation von EmboCept® S, verglichen mit der alleinigen HAI mit Irinotecan, schließen.

Tanaka et al. (2014) untersuchten an einem transplantierten, orthotopen VX2-Lebermetastasenmodell in Kaninchen die pharmakokinetischen Eigenschaften einer einmaligen, selektiven TACE mit Tandem™ 40 μ m beladen mit Irinotecan. Sie schilderten, dass zusätzlich zum zytotoxischen Effekt durch das Irinotecan auch die Induktion einer Ischämie durch die Embolisatpartikel bei der antitumorösen Wirkung der Behandlung eine Rolle spielt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war allerdings nach HAI mit Tandem™ 40 μ m beladen mit Irinotecan zwar die höchste Apoptoserate, jedoch kein Unterschied in der Expression von HIF-1 α oder in Bezug auf DNA-Schädigung im Vergleich zur alleinigen HAI mit Irinotecan nachweisbar. Auch waren nach HAI mit Tandem™ 40 μ m beladen mit Irinotecan die niedrigsten CPT-11- und SN-38-Konzentrationen im Tumorgewebe im Vergleich zu den übrigen Behandlungsgruppen detektierbar. Somit kann die erhöhte Apoptoserate nicht nur auf die zytotoxische Wirkung des Irinotecans zurückgeführt werden, sondern gegebenenfalls auch auf die permanente Okklusion durch die beladbaren Embolisatpartikel Tandem™ 40 μ m und die daraus resultierende Hypoxie. Auch Kato et al. (1981) beschrieben in der ersten klinischen Studie zur Chemoembolisation mit Ethylzellulose und Mitomycin mc, dass die Verwendung von Embolisatpartikeln eine Ischämie und eine dadurch gesteigerte antitumoröse Wirkung bewirkt.

Gnutzmann et al. (2015) belegten an einem tumorfreien Schweinmodell, dass auch noch 24 Stunden nach der einmaligen, selektiven TACE mit Tandem™ 40 μ m beladen mit Irinotecan die CPT-11- und SN-38-Konzentrationen über dem therapeutischen Wert im Lebergewebe feststellbar waren. Auch zeigten sie, dass die Freisetzung aus den Tandem™ 40 μ m-Partikeln im Vergleich zu anderen DEBs verlangsamt war und die maximale Gewebekonzentration im Tumorgewebe erst nach 24 Stunden erreicht wurde (Gnutzmann et al. 2015). Die oben beschriebenen Zusammenhänge werfen die Frage auf, ob darüber hinaus ein noch späterer Zeitpunkt oder eine Verlaufsmessung für den Nachweis der CPT-11- und SN-38-Konzentration nach der HAI mit Tandem™ 40 μ m beladen mit Irinotecan hätten gewählt werden sollen. Eine Limitation der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die Beurteilbarkeit der HAI mit Tandem™ 40 μ m beladen mit

Irinotecan liegt folglich in der nur einmaligen Bestimmung der CPT-11- und SN-38-Konzentration vier Stunden nach der Behandlung.

Erstmals wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die beiden verwendeten Embolisatpartikel (EmboCept® S und Tandem™) direkt miteinander verglichen und deren Effekte auf molekularer Ebene analysiert. Es zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate nach HAI mit Tandem™ 40 µm, beladen mit Irinotecan. Dagegen war die Anzahl γH2AX-positiver Zellen als Marker für DNA-Schädigung und die Expression von HIF-1α nach HAI mit EmboCept® S und Irinotecan erhöht. Dennoch ist vier Stunden nach der Behandlung der Vergleich beider Embolisatpartikel im Hinblick auf die molekularen Veränderungen nur eingeschränkt aussagekräftig, da der Beobachtungszeitraum für Tandem™ 40 µm vermutlich zu kurz gewählt worden war. Der Zeitpunkt von vier Stunden nach der Behandlung wurde gewählt, da sich dieser in Vorversuchen der Arbeitsgruppe als optimal zur Detektion der CPT-11- und SN-38-Konzentration nach alleiniger Gabe von Irinotecan herausgestellt hatte. In zwei präklinischen Langzeitstudien am orthotopen CC531-lac-Z-KRLM-Modell in WAG/Rij-Ratten konnte beispielsweise vier Wochen nach der Behandlung für beide Embolisatpartikel in Kombination mit Irinotecan eine verbesserte antitumoröse Wirkung im Vergleich zur Kombination mit anderen Zytostatika gezeigt werden (Saenger et al. 2004; Eyol et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit bewirkte die HAI mit Tandem™ 40 µm beladen mit Irinotecan nur im Hinblick auf die Apoptoserate einen deutlichen Unterschied gegenüber der systemischen Applikation von Irinotecan. In einer klinischen Langzeitstudie konnte dagegen eine signifikante Überlegenheit der TACE mit DEB, beladen mit Irinotecan, als Second- und Thirdline-Therapie bei Patienten mit irresektablen KRLM gegenüber der systemischen Gabe von FOLFIRI im Hinblick auf das mediane Überleben (22 gegen 15 Monate), das progressionsfreie Überleben (7 gegen 4 Monate), die Ansprechrate (68,4 % gegen 20 %) und die verbesserte Lebensqualität (8 gegen 3 Monate) gezeigt werden (Fiorentini et al. 2012). Dies zeigt, dass die TACE mit DEB, beladen mit Irinotecan, bei Patienten mit KRLM langfristig eine deutlich gesteigerte antitumoröse Wirkung aufweist. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Wirkung auf molekularer Ebene aufgrund des Bestimmungzeitpunktes vier Stunden nach Behandlung nicht abschließend verifiziert werden.

Zusammenfassend zeigte sich vier Stunden nach der Behandlung ein deutlicher Vorteil der HAI mit Irinotecan und dem Embolisatpartikel EmboCept® S in Bezug auf vermehrte Veränderungen auf molekularer Ebene sowie auf eine signifikant erhöhte SN-38-Konzentration im Tumorgewebe.

5.3.2 Onivyde®-Gruppe

Onivyde® ist nanoliposomales Irinotecan. Durch die Liposomkapsel wird es vor einem vorzeitigen Abbau und Metabolismus geschützt, akkumuliert im Tumorgewebe und zirkuliert dadurch deutlich länger im Kreislauf (Drummond et al. 2006; Kalra et al. 2014). Seit November 2016 ist Onivyde® sowohl in Deutschland als auch in den USA für das metastasierte, Gemcitabin-resistente Pankreaskarzinom in Kombination mit 5-FU und Folsäure zugelassen (Zhang H 2016; European Medicines Agency 2016). Onivyde® könnte auch in der Therapie des KRK eine neue, vielversprechende Option als Secondline-Therapie darstellen (Zhang H 2016). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Onivyde® erstmalig als HAI appliziert und die molekularen Veränderungen in KRLM *in vivo* untersucht.

Hierbei zeigten sich bereits vier Stunden nach der Behandlung der KRLM mit Onivyde® auf molekularer Ebene deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. In den beiden Gruppen, die mittels HAI behandelt wurden, waren im Vergleich zur systemischen Gabe vermehrte DNA-Schäden und eine erhöhte Apoptoserate nachweisbar. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen einer Studie von Chen P-Y et al. (2013). Sie untersuchten den Effekt von nanoliposomalen Irinotecan in einem orthotopen, xenotransplantierten Glioblastom-Modell an immundefizienten Mäusen. Durch die intracraniale, intratumorale Applikation von nanoliposomalen Irinotecan konnten im Vergleich zur systemischen Applikation und zur Kontrollgruppe eine erhöhte Apoptoserate im Tumorgewebe sowie eine verbesserte antitumoröse Wirkung erzielt werden (Chen P-Y et al. 2013). Daraus lässt sich schließen, dass die intratumorale bzw. lokoregionäre Therapie mit Onivyde® im Vergleich zur systemischen Applikation im Hinblick auf vermehrte molekulare Veränderungen auch für die Behandlung von KRLM einen Vorteil darstellen kann.

Überraschenderweise verursachte die systemische Applikation von Onivyde® die höchste Expression von HIF-1 α . Allerdings war im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen keine gesteigerte Apoptoserate nachweisbar. Dies zeigt, dass die nachgewiesene Hypoxie nicht zu einem vermehrten Zelluntergang führte. Vermutlich ist die erhöhte Expression von HIF-1 α auf die ubiquitäre Expression von HIF-1 α in kolorektalen Karzinomzellen zurückzuführen (Zhong et al. 1999). Kritisch ist zu sehen, dass im Zentrum von soliden Tumoren oftmals eine ausgeprägte Hypoxiezone zu finden ist. Diese entsteht aufgrund der Minderversorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff, verursacht durch das schnelle Wachstum und die insuffiziente Neoangiogenese (Bertout et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich bei der Bestimmung der CPT-11- und SN-38-Konzentrationen im Plasma sowie im Tumor- und Lebergewebe keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Gleichwohl beschrieben Kalra et al. (2014) an einem xenotransplantierten, subkutanen KRK-Modell in immundefizienten Mäusen, dass bei gleicher Dosis durch die Liposomkapsel des nanoliposomalen Irinotecan eine verlängerte SN-38-Exposition des Tumorgewebes im Vergleich zu freiem Irinotecan

erreicht werden kann. Sie begründeten dies mit dem Schutzeffekt der Liposomkapsel, welcher eine rasche Metabolisierung des nanoliposomalen Irinotecans verhindert (Kalra et al. 2014; Drummond et al. 2006). Demnach könnte die Bestimmung der CPT-11- und SN-38-Konzentration zu einem späteren Zeitpunkt, als in der vorliegenden Studie, nochmals zu einem differenteren Ergebnis führen.

Zusammenfassend ist jedoch festzustellen, dass sich im Vergleich zur systemischen Applikation von Onivyde® bereits vier Stunden nach HAI mit Onivyde® im Hinblick auf DNA-Schädigung und Apoptoserate deutlich vermehrte, molekulare Veränderungen zeigten. In diesem Zeitraum waren jedoch im Vergleich zur alleinigen HAI mit Onivyde® keine vermehrten Veränderungen auf molekularer Ebene durch die zusätzliche Applikation von EmboCept® S nachweisbar.

5.4 Versuchsabschnitt III: Bestimmung des Tumoransprechens

In diesem Versuchsabschnitt wurde die Wirkung der HAI mit Onivyde® und EmboCept® S in verschiedenen Therapieschemata (s. Kapitel 3.5.6) auf CC531-KRLM *in vivo* im Hinblick auf molekulare Schäden und Veränderungen des Tumolvolumens 72 Stunden nach der Behandlung untersucht.

Onivyde® ist ein neues vielversprechendes Zytostatikum. Es ist, wie oben beschrieben, zur Behandlung des metastasierten, Gemcitabin-resistenten Pankreaskarzinoms in Kombination mit 5-FU und Folsäure zugelassen (Zhang H 2016; Wang-Gillam et al. 2016). Onivyde® wurde aber auch in einer ersten klinischen Studie zur Behandlung des metastasierten KRK erprobt (Chibaudel et al. 2016). Bereits in der Studie zur Etablierung des nanoliposomalen Irinotecans an einem subkutanen, xenotransplantierten KRK-Modell in immundefizienten Mäusen zeigte die systemische Applikation von nanoliposomalen Irinotecan im Vergleich zum freien Irinotecan eine deutlich verbesserte antitumoröse Wirkung sowie eine vierfach verminderte systemische Toxizität (Drummond et al. 2006). Allerdings ist trotz der guten Erfolge bislang die molekulare Wirkung von Onivyde® unerforscht. Auch der Einsatz von Onivyde® als HAI bzw. in Kombination mit Embolisatpartikeln als TACE ist bei Patienten mit KRLM zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht untersucht worden.

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α ist aufgrund seiner physiologischen Funktion ein etablierter Marker zum Nachweis einer Gewebhypoxie (Zhong et al. 1999). HIF-1 α spielt allerdings auch eine Rolle in der Karzinogenese. Unter steigender Malignität der kolorektalen Präkanzerosen zeigte sich beispielsweise eine steigende HIF-1 α -Expression (Simiantonaki et al. 2008). Außerdem wird HIF-1 α ubiquitär im KRK überexprimiert, nicht jedoch im gesunden Leber- und Kolongewebe (Zhong et al. 1999). Cao et al. (2009) belegten darüber hinaus in einer klinischen Studie an 71 unbehandelten Patienten mit KRK, dass eine erhöhte HIF-1 α -Expression mit einem schlechteren Tumorstadium und dem Auftreten von KRLM assoziiert ist (Cao et al. 2009). Dies zeigt, dass HIF-1 α auch physiologisch, ohne erfolgte Behandlung, im kolorektalen Tumorgewebe exprimiert wird. Der Einfluss dieser Expression auf die Prognose und das Outcome von Patienten mit KRK ist allerdings stark umstritten, da die klinischen Studien eine große Heterogenität aufweisen (Ioannou et al. 2015; Chen Z et al. 2013). Jedoch führen anoxische bzw. hypoxische Verhältnisse im Gewebe zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität. In der Behandlung von Tumoren wird dieser Effekt genutzt, um die Diffusion des gleichzeitig applizierten Zytostatikums zu verbessern und so eine gesteigerte Wirkung erzielen zu können (Wallace et al. 1990).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Therapie-induzierte Hypoxie, verursacht durch die Verwendung von Embolisatpartikeln als HAI, mit Hilfe des Antikörpers gegen HIF-1 α untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter

Unterschied in der Expression von HIF-1 α nach HAI mit EmboCept® S. Dagegen waren, verglichen mit der Kontrollgruppe, keine signifikanten Unterschiede in der Angiogenese, Apoptoserate oder der DNA-Schädigung nachweisbar. Die Hypoxie hat folglich nicht zu einem vermehrten Zelluntergang oder einer gesteigerten DNA-Schädigung geführt.

Zudem zeigte die IHC-Analyse, dass durch die HAI mit Onivyde® im Vergleich zur Kontrollgruppe und HAI mit EmboCept® S eine deutlich erhöhte DNA-Schädigung und Apoptoserate verursacht wurden. Der zusätzliche Einsatz von EmboCept® S konnte keine Steigerung dieser Parameter erzielen. Auch die Expression von HIF-1 α war nach HAI mit Onivyde® und HAI mit EmboCept® S und Onivyde® vergleichbar. Zu erwarten wäre einerseits aufgrund der Anreicherung des Zytostatikums durch die zusätzliche Applikation von Embolisatpartikeln eine Steigerung der molekularen Veränderungen gewesen (Sato et al. 2017; Bödeker et al. 2003). Andererseits kommt es bereits durch die Liposomkapsel des nanoliposomalen Irinotecans zu einer Akkumulation des Irinotecans im Tumorgewebe (Kalra et al. 2014). Zusätzlich wird es durch den *enhanced-permeability-and-retention*-(EPR)-Effekt besser in das Tumorgewebe aufgenommen als freies Irinotecan (s. Kapitel 1.3.2). Der EPR-Effekt beschreibt, dass während der Neoangiogenese im Tumorgewebe fenestriertes Endothel entsteht, welches besonders durchlässig für Makromoleküle und Liposome ist. Zusätzlich wird der Abtransport durch fehlende Lymphabflusswege im Tumor verlangsamt. Dadurch kommt es zur Akkumulation des nanoliposomalen Irinotecans im Tumorgewebe. (Matsumura und Maeda 1986; Kalra et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte die transiente Okklusion der tumorversorgenden Arterien durch den Embolisatpartikel EmboCept® S diese ohnehin schon gesteigerte Aufnahme und Wirkung des nanoliposomalen Irinotecans im Tumorgewebe nicht zusätzlich steigern.

Die HAI mit Onivyde® und die HAI mit EmboCept® S und Onivyde® bewirkte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens von Tag 10 zu Tag 13. Ähnliche Ergebnisse beschrieben Saenger et al. (2004) in einer präklinischen Studie am orthotopen CC531-lac-Z-KRLM-Modell in WAG/Rij-Ratten zur HAI mit Irinotecan und EmboCept® S. Sie bewiesen eine signifikante Reduktion des Tumorstadiums, der Tumorzelllast sowie der Zellzahl durch die HAI mit EmboCept® S und Irinotecan im Vergleich zur Kontrollgruppe und der HAI mit EmboCept® S und 5-FU. In der vorliegenden Arbeit lässt sich 72 Stunden nach der Behandlung zeigen, dass sowohl die HAI mit EmboCept® S und Onivyde® als auch die alleinige HAI mit Onivyde® eine gute antitumoröse Wirkung aufweisen. Jedoch zeigte sich kein Vorteil für die Kombination aus EmboCept® S und Onivyde® gegenüber der alleinigen HAI mit Onivyde®.

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatte sich der Zeitpunkt 72 Stunden nach der Behandlung als ideal für die erneute Tumolvolumenbestimmung mittels Kleintierultraschall herausgestellt. Die unbehandelten Tiere wiesen zu diesem Zeitpunkt noch keine Zeichen einer Tumorklast auf, während in den Behandlungsgruppen bereits

statistisch signifikante Unterschiede im Tumolvolumen messbar sind (Sperling et al. 2012; Sperling et al. 2013).

Die alleinige HAI mit Onivyde® bewirkte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Tumolvolumenreduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für die systemische Anwendung von nanoliposomalem Irinotecan in Kombination mit 5-FU und Folsäure als Secondline-Therapie bei Patienten mit metastasiertem KRK konnte bereits in einer klinischen Studie vergleichbare Werte für die objektive RR und das mediane Überleben verglichen mit der systemischen, modifizierten FOLFIRI-Therapie nachgewiesen werden. Das Nebenwirkungsprofil war dagegen unter der Kombination aus nanoliposomalen Irinotecan, 5-FU und Folsäure verbessert (Chibaudel et al. 2016). Der Einsatz von Onivyde® in der Behandlung von Patienten mit KRLM ist allerdings nur zögerlich, da bei ähnlichem antitumorösem Effekt die Kosten der Therapie mit Onivyde® (ca. 1.000€ pro 10 ml 5 mg/ml) im Vergleich zu Irinotecan (ca. 100€ für 40 mg 20 mg/ml) sehr hoch sind (Gemeinsamer Bundesausschuss 2013; DocMorris).

In der vorliegenden Arbeit gab es weder in der HE-Färbung noch in der IHC Hinweise auf eine Zellschädigung des gesunden Lebergewebes durch die HAI und den Einsatz des Embolisatpartikels EmboCept® S. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen Pieper et al. (2015). Sie konnten in gesunden Minischweinen nach einer HAI mit EmboCept® S keine histologischen Schäden des Lebergewebes feststellen. Weiterhin zeigte die vorliegende Arbeit, dass auch die HAI mit Onivyde® zu keiner signifikanten Leberschädigung im Vergleich zur Kontrollgruppe führte.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass die HAI mit Onivyde® eine gute antitumoröse Wirkung aufweist und diese mit vermehrten, molekular nachweisbaren Veränderungen verbunden ist. Ein Vorteil der HAI mit Onivyde® in Kombination mit EmboCept® S ergab sich im Vergleich zur alleinigen HAI mit Onivyde® nicht. Unter keinem Therapieschema war eine Schädigung des gesunden Lebergewebes nachweisbar.

5.5 Fazit

5.5.1 Fragestellung

Zeigen kolorektale Adenokarzinomzellen der Ratte unter Behandlung mit Irinotecan *in vitro* nachweisbare molekulare Veränderungen?

- Nach 72-stündiger Behandlung der CC531-Zellen mit aufsteigenden Irinotecankonzentrationen war eine deutlich erhöhte Expression der Proliferations-, Hypoxie und Apoptosemarker nachweisbar.

Zeigt die zusätzliche Verwendung von Embolisatpartikeln im Vergleich zur alleinigen HAI mit Chemotherapie einen größeren Effekt auf die Proliferations-, Angiogenese- und Apoptoserate des Tumors?

- Die Kombination aus Irinotecan und EmboCept® S war vier Stunden nach der Behandlung im Hinblick auf Apoptoserate und DNA-Schäden der alleinigen HAI mit Irinotecan überlegen.
- Dagegen war für die Kombination aus Onivyde® und EmboCept® S im Vergleich zur alleinigen HAI mit Onivyde® im Hinblick auf molekulare Veränderungen weder vier noch 72 Stunden nach der Behandlung ein Vorteil nachweisbar.

Verursacht der Einsatz von Embolisatpartikeln eine auf molekularer Ebene nachweisbare Hypoxie?

- Nach der spezifischen Behandlung zeigte sich eine erhöhte Expression von HIF-1 α im Tumorgewebe. Allerdings kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden, ob dies auf eine Therapie-induzierte Hypoxie, verursacht durch die Verwendung von Embolisatpartikeln, oder die ubiquitäre Expression von HIF-1 α in kolorektalen Karzinomzellen zurückzuführen ist.

Kann zwischen Embolisatpartikel-verursachten Hypoxie- und Chemotherapie-induzierten DNA-Schäden differenziert werden?

- Die IHC mit dem Antikörper gegen γ H2AX bietet eine gute Möglichkeit zur Detektion von Chemotherapie-induzierten Schäden.
- Die IHC mit dem Antikörper gegen HIF-1 α ist dagegen aufgrund der ubiquitären Expression in kolorektalen Karzinomzellen nur eingeschränkt einsetzbar (s.o.).

Korrelieren vier Stunden nach der Behandlung die molekularen Veränderungen mit den nachgewiesenen CPT-11- und SN-38-Konzentrationen im Tumorgewebe?

- Die Kombination aus HAI mit Irinotecan und EmboCept® S verursachte eine signifikant erhöhte SN-38-Konzentration im Tumorgewebe und deutlich gesteigerte molekulare Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung.

Welche Veränderungen lassen sich im gesunden Lebergewebe auf molekularer Ebene unter den verschiedenen Therapieformen 72 Stunden nach der Behandlung finden?

- Im gesunden Lebergewebe waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe nachweisbar.

5.5.2 Schlussfolgerung

Der Einsatz von EmboCept® S und Irinotecan als HAI konnte vermehrte Veränderungen auf molekularer Ebene im Hinblick auf DNA-Schäden, Hypoxie- und Apoptoserate sowie eine signifikant höhere Konzentration von SN-38 und CPT-11 im Tumorgewebe erzielen. Die HAI mit Onivyde® führte im Vergleich zur systemischen Applikation und der Kontrollgruppe zu einem vermehrten molekularen Schaden sowie zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dagegen zeigte die Kombination aus Onivyde® und EmboCept® S im Hinblick auf molekulare Veränderungen und Tumolvolumenreduktion gegenüber der alleinigen HAI mit Onivyde® keinen Vorteil.

Alle eingesetzten Substanzen sind bereits zum Einsatz am Menschen zugelassen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die antitumoröse Wirkung der verwendeten Substanzen auch im Einsatz als HAI und veranschaulichen deren molekulare Wirkung. Die direkte Übertragung auf den Menschen ist versuchsbedingt allerdings nur eingeschränkt möglich.

6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom zählt in Deutschland mit über 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr zu der am dritthäufigsten diagnostizierten Krebsentität. Etwa 50 % der Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung Lebermetastasen. Trotz neuer Therapiemöglichkeiten sind diese prognosebestimmend. Die einzige kurative Therapie besteht in der Resektion der Metastasen. Nach der S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom ist für Patienten mit primär irresektablen Lebermetastasen eine systemische Chemotherapie nach FOLFOX- oder FOLFIRI-Schema die Standardtherapie. Allerdings besitzen diese ein relevantes Nebenwirkungsprofil. Für Patienten mit therapierefraktären, progredienten Lebermetastasen sowie Patienten, die unter der Chemotherapie starke toxische Nebenwirkungen entwickeln, stellen lokoregionäre Therapieansätze, wie die hepatoarterielle Infusion (HAI) und transarterielle Chemembolisation (TACE), eine alternative Behandlungsmöglichkeit dar. In klinischen Studien zeigten sich im Hinblick auf das mediane Überleben und die Verbesserung der Lebensqualität bereits vielversprechende Ergebnisse. Der Einsatz von Irinotecan und nanoliposomalem Irinotecan ist allerdings bei kolorektalen Lebermetastasen bis dato nicht ausreichend untersucht. Auch ist der genaue molekulare Wirkmechanismus der HAI und TACE sowohl mit beladbaren als auch unbeladbaren Embolisatpartikel bisher nicht im Detail geklärt. In dieser Studie wurde deshalb die Behandlung kolorektaler Lebermetastasen mittels HAI anhand eines CC531-KRLM-Modells in WAG/Rij-Ratten insbesondere in Hinblick auf molekulare Schäden untersucht. Hierzu wurden die Embolisatpartikel Tandem™ 40 µm und EmboCept® S sowie die Chemotherapeutika Irinotecan und Onivyde® (nanoliposomales Irinotecan) verwendet und deren Wirkweise analysiert.

Im ersten Versuchsabschnitt wurde in einem *in-vitro*-Versuch das Verhalten von CC531 kolorektalen Rattenkrebszellen unter Behandlung mit Irinotecan für 72 Stunden mittels Western Blot im Hinblick auf die Expression von Proliferations-, Apoptose- und Hypoxiemarker beurteilt. Unter steigenden Irinotecankonzentrationen zeigten sich linear korrelierend erhöhte Proliferations-, Hypoxie- und Apoptoseraten.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurden 5×10^5 CC531-Zellen subkapsulär in die Leber von WAG/RIJ-Ratten implantiert. Zehn Tage nach der Zellimplantation wurden die WAG/RIJ-Ratten mit unterschiedlichen Medikamentenkombinationen (NaCl, Irinotecan systemisch, HAI mit Irinotecan, HAI mit EmboCept® S + Irinotecan, HAI mit Tandem™ + Irinotecan, Onivyde® systemisch, HAI mit Onivyde®, HAI mit EmboCept® S + Onivyde®) behandelt. Vier Stunden danach erfolgte die Entnahme von Blut, Tumor- und gesundem Lebergewebe. Mittels immunhistochemischer Färbung wurden die molekularen Veränderungen im Tumorgewebe untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe und der systemischen Applikation des jeweiligen Zytostatikums waren eine gesteigerte DNA-

Schädigung und Apoptoserate in den Gruppen, die mittels HAI mit Irinotecan und Embolisatpartikeln behandelt wurden, und der Gruppe, die mittels HAI mit Onivyde® behandelt wurde, nachweisbar. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich allerdings, dass der Antikörper gegen HIF-1 α vier Stunden nach der Behandlung nur eingeschränkt als Marker für eine Therapie-induzierte Hypoxie geeignet ist, die durch die Verwendung von Embolisatpartikeln verursacht wurde.

Im dritten Versuchsabschnitt wurden ebenfalls 5×10^5 CC531-Zellen pro Tumor subkapsulär in die Leber von WAG/RIJ-Ratten injiziert. Zehn Tage nach der Tumorimplantation wurden die WAG/RIJ-Ratten mit unterschiedlichen Medikamentenkombinationen (NaCl, HAI mit Onivyde®, HAI mit EmboCept® S, HAI mit EmboCept® S + Onivyde®) behandelt. An Tag 10 und 13 nach der Tumorimplantation wurde das Tumolvolumen mittels Kleintiersonographie bestimmt und somit die Veränderung des Tumorwachstums berechnet. Außerdem wurde an Tag 13 das gesunde Leber- und Tumorgewebe entnommen und mittels immunhistochemischer Färbung auf molekulare Veränderungen untersucht. In den Gruppen, die mittels HAI mit Onivyde® und HAI mit EmboCept® S + Onivyde® behandelt worden waren, waren eine erhöhte DNA-Schädigung und Apoptoserate nachweisbar. In beiden Gruppen zeigte sich eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe zwischen Tag 10 und Tag 13. Ein Vorteil für die HAI mit Onivyde® in Kombination mit EmboCept® S im Vergleich zur alleinigen HAI mit Onivyde® war allerdings nicht nachweisbar. Auch 72 Stunden nach der Behandlung zeigte sich der Antikörper gegen HIF-1 α nur eingeschränkt als Nachweis für eine Therapie-induzierte Hypoxie geeignet, da physiologisch HIF-1 α ubiquitär im KRK exprimiert wird

Abschließend konnte die Überlegenheit der HAI mit Irinotecan und EmboCept® S gegenüber der alleinigen HAI und der systemischen Applikation von Irinotecan im Hinblick auf molekulare Veränderungen vier Stunden nach der Behandlung in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Weiterhin waren in der Gruppe, die mit HAI mit Onivyde® behandelt wurde, im Vergleich zur systemischen Applikation und der Kontrollgruppe 72 Stunden nach der Behandlung erhöhte molekulare Veränderungen und eine signifikante Tumorreduktion belegbar. Ein Vorteil für die zusätzliche Applikation von EmboCept® S zur HAI mit Onivyde® konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

7 Publikationen

7.1 Kongressbeiträge

7.1.1 21. Chirurgische Forschungstage vom 21.-23. September 2017 in Köln

- Poster:

Role of CC531 Rat Colorectal Cancer Cell Line in Translational Research – Comparison to Two Human Colorectal Cancer Cell Lines Upon Treatment with Irinotecan

H. Nowack, M. Spitzner, J. Sperling, M. Ghadimi, A. Kauffels

- Vortrag:

Hepatic Arterial Infusion of Irinotecan Leads to Higher Tumor Tissue Concentration of SN38 When Combined with Embocept in a Rat Model of Colorectal Liver Metastases

A. Kauffels, M. Kitzmüller, A. Gruber, H. Nowack, M. Czejka, M. Ghadimi, J. Sperling

7.1.2 EKFS Cancer Symposium 2017 vom 15.-17. November in Göttingen

- Poster:

Role of CC531 Rat Colorectal Cancer Cell Line in Translational Research – Comparison to Two Human Colorectal Cancer Cell Lines Upon Treatment with Irinotecan

H. Nowack, M. Spitzner, J. Sperling, M. Ghadimi, A. Kauffels

- Poster:

Hepato-arterial infusion of nanoliposomal irinotecan in an orthotopic preclinical model of colorectal liver metastases - Enhanced effect in combination with embolization particles

Kauffels-Sprenger A., Nowack H, Ghadimi M, Sperling J

7.1.3 135. Kongress Deutsche Gesellschaft für Chirurgie vom 17.-20. April 2018 in Berlin

- Vortrag:

Hepato-arterielle Infusion mit nanoliposomalem Irinotecan in einem orthotopen präklinischen Modell für kolorektale Lebermetastasen – Verstärktes Tumoransprechen durch Kombination mit Embolisationspartikeln

Anne Kauffels-Sprenger, H. Nowack, H. Bohnenberger, M. Ghadimi, J. Sperling

7.2 Originalarbeit

- Kauffels A, Kitzmüller M, Gruber A, Nowack H, Bohnenberger H, Spitzner M, Kuthning A, Sprenger T, Czejka M, Ghadimi M, Sperling J (2019):

Hepatic arterial infusion of irinotecan and EmboCept® S results in high tumor concentration of SN-38 in a rat model of colorectal liver metastases.

Clinical & Experimental Metastasis, 36, 57–66

8 Literaturverzeichnis

- Bertout JA, Patel SA, Simon MC (2008): The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 967–975
- Blackshear PJ, Dorman FD, Blackshear PL, Varco RL, Buchwald H (1972): The design and initial testing of an implantable infusion pump. *Surg Gynecol Obstet* **134**, 51–56
- Blümmel J, Reinhardt S, Schäfer M, Gilbert C, Sun L, Ren J (2012): Drug-eluting Beads in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma and Colorectal Cancer Metastases to the Liver. *Eur Oncol Haematol* **8**, 162-166
- Bödeker H, Kamphorst E-J, Wünsch PH, Linnemann U, Berger MR (2003): Superiority of combined chemo-embolization and portal infusion with 5-fluorouracil over locoregional infusion concepts in Novikoff hepatoma-bearing rats. *J Cancer Res Clin Oncol* **129**, 655–661
- Brand GmbH+CO KG: Zählkammern
http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/GK900/Zaehlkammern/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_d.pdf; Zugriff am 17.07.2017
- Breedis C, Young G (1954): The blood supply of neoplasms in the liver. *Am J Pathol* **30**, 969–977
- Brierley J: Kolon und Rektum. In: Wittekind C (Hrsg.): *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 8. Auflage; Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2017, 97–102
- Burnette WN (1981): “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195–203
- Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferrareso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P (1997): The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* **183**, 477–485
- Cao D, Hou M, Guan Y, Jiang M, Yang Y, Gou H (2009): Expression of HIF-1 α and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC Cancer* **9**, 432
- Cercek A, Boucher TM, Gluskin JS, Aguiló A, Chou JF, Connell LC, Capanu M, Reidy-Lagunes D, D’Angelica M, Kemeny NE (2016): Response rates of hepatic arterial infusion pump therapy in patients with metastatic colorectal cancer liver metastases refractory to all standard chemotherapies. *J Surg Oncol* **114**, 655–663
- Chen P-Y, Ozawa T, Drummond DC, Kalra A, Fitzgerald JB, Kirpotin DB, Wei K-C, Butowski N, Prados MD, Berger MS, et al. (2013): Comparing routes of delivery for nanoliposomal irinotecan shows superior anti-tumor activity of local administration in treating intracranial glioblastoma xenografts. *Neuro Oncol* **15**, 189–197
- Chen Z, He X, Xia W, Huang Q, Zhang Z, Ye J, Ni C, Wu P, Wu D, Xu J, et al. (2013): Prognostic Value and Clinicopathological Differences of HIFs in Colorectal Cancer: Evidence from Meta-Analysis. *PLoS ONE* **8**, e80337

- Chibaudel B, Maindrault-Gœbel F, Bachet J-B, Louvet C, Khalil A, Dupuis O, Hammel P, Garcia M-L, Bennamoun M, Brusquant D, et al. (2016): PEPCOL: a GERCOR randomized phase II study of nanoliposomal irinotecan PEP02 (MM-398) or irinotecan with leucovorin/5-fluorouracil as second-line therapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Med* 5, 676–683
- Collins JM (1984): Pharmacologic rationale for regional drug delivery. *J Clin Oncol* 2, 498–504
- Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, Carteni G, Agostara B, Pezzella G, Manzione L, et al. (2005): Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol* 23, 4866–4875
- Curley SA, Hohn DC, Roh MS (1990): Hepatic artery infusion pumps: cannulation techniques and other surgical considerations. *Langenbecks Arch Chir* 375, 119–124
- D'Angelica MI, Correa-Gallego C, Paty PB, Cercek A, Gewirtz AN, Chou JF, Capanu M, Kingham TP, Fong Y, DeMatteo RP, et al. (2015): Phase II trial of hepatic artery infusional and systemic chemotherapy for patients with unresectable hepatic metastases from colorectal cancer: Conversion to resection and long-term outcomes. *Ann Surg* 261, 353–360
- De Greef K, Rolfo C, Russo A, Chapelle T, Bronte G, Passiglia F, Coelho A, Papadimitriou K, Peeters M (2016): Multidisciplinary management of patients with liver metastasis from colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 22, 7215–7225
- Dhir M, Jones HL, Shuai Y, Clifford AK, Perkins S, Steve J, Hogg ME, Choudry MHA, Pingpank JF, Holtzman MP, et al. (2017): Hepatic Arterial Infusion in Combination with Modern Systemic Chemotherapy is Associated with Improved Survival Compared with Modern Systemic Chemotherapy Alone in Patients with Isolated Unresectable Colorectal Liver Metastases: A Case-Control Study. *Ann Surg Oncol* 24, 150–158
- DocMorris: Onivyde
https://www.docmorris.de/onivyde-5-mgml-konzzhersteinflsg/11868492?wt_mc=psm.psm_cpc.medizinfuchs.default.&erid=1522847764803534504; Zugriff am 04.04.2018
- Drott J, Starkhammar H, Kjellgren K, Berterö C (2016): The trajectory of neurotoxic side effects' impact on daily life: a qualitative study. *Support Care Cancer Off J Multinatl Assoc Support Care Cancer* 24, 3455–3461
- Drummond DC, Noble CO, Guo Z, Hong K, Park JW, Kirpotin DB (2006): Development of a Highly Active Nanoliposomal Irinotecan Using a Novel Intraliposomal Stabilization Strategy. *Cancer Res* 66, 3271–3277
- Ducreux M, Ychou M, Laplanche A, Gamelin E, Lasser P, Hussein F, Quenet F, Viret F, Jacob J-H, Boige V, et al. (2005): Hepatic arterial oxaliplatin infusion plus intravenous chemotherapy in colorectal cancer with inoperable hepatic metastases: a trial of the gastrointestinal group of the Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 23, 4881–4887

- Ensminger WD, Rosowsky A, Raso V, Levin DC, Glode M, Come S, Steele G, Frei E (1978): A Clinical-Pharmacological Evaluation of Hepatic Arterial Infusions of 5-Fluoro-2'-deoxyuridine and 5-Fluorouracil. *Cancer Res* 38, 3784–3792
- European Medicines Agency: Onivyde (irinotecan): An Overview of Onivyde and why it is authorised in the EU. London 2016
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/004125/WC500215006.pdf; Zugriff am 09.07.2018
- Eyol E, Boleij A, Taylor RR, Lewis AL, Berger MR (2008): Chemoembolisation of rat colorectal liver metastases with drug eluting beads loaded with irinotecan or doxorubicin. *Clin Exp Metastasis* 25, 273–282
- Fiorentini G, Aliberti C, Tilli M, Mulazzani L, Graziano F, Giordani P, Mambrini A, Montagnani F, Alessandroni P, Catalano V, Coschiera P (2012): Intra-arterial infusion of irinotecan-loaded drug-eluting beads (DEBIRI) versus intravenous therapy (FOLFIRI) for hepatic metastases from colorectal cancer: final results of a phase III study. *Anticancer Res* 32, 1387–1395
- Gemeinsamer Bundesausschuss (2013): Beschluss des Gemeinsamen Bundesausschusses über eine Änderung der Arzneimittel-Richtlinie (AM-RL): Anlage XII – Beschlüsse über die Nutzenbewertung von Arzneimitteln mit neuen Wirkstoffen nach § 35a SGB V – Aflibercept. Berlin 2013
https://www.g-ba.de/downloads/39-261-1797/2013-08-15_AM-RL-XII_Aflibercept_BAnz.pdf; Zugriff am 31.03.2018
- Gnutzmann DM, Mechel J, Schmitz A, Köhler K, Krone D, Bellemann N, Gockner TL, Mokry T, Kortés N, Sommer C-M, et al. (2015): Evaluation of the plasmatic and parenchymal elution kinetics of two different irinotecan-loaded drug-eluting embolics in a pig model. *J Vasc Interv Radiol* 26, 746–754
- Goldman A, Speicher DW (2015): UNIT 10.7 Electrophoresis from Polyacrylamide Gels. *Curr Protoc Protein Sci* 82, 10.7.1-10.7.16
- Groot Koerkamp B, Sadot E, Kemeny NE, Gönen M, Leal JN, Allen PJ, Cercek A, DeMatteo RP, Kingham TP, Jarnagin WR et al. (2017): Perioperative Hepatic Arterial Infusion Pump Chemotherapy Is Associated With Longer Survival After Resection of Colorectal Liver Metastases: A Propensity Score Analysis. *J Clin Oncol* 35, 1938–1944
- Guichard S, Terret C, Hennebelle I, Lochon I, Chevreaux P, Frétygny E, Selves J, Chatelut E, Bugat R, Canal R (1999): CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase I activities in tumour and normal colon and liver tissues. *Br J Cancer* 80, 364–370
- Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu F-F, O'Sullivan B, He Z, Peng Y, Tan A-C, et al. (2011): Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med* 17, 860–866
- Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z (2003): DNA Damage Induced by DNA Topoisomerase I- and Topoisomerase II- Inhibitors Detected by Histone H2AXphosphorylation in Relation to the Cell Cycle Phase and Apoptosis. *Cell Cycle* 2, 613–618

- Idée J-M, Guiu B (2013): Use of Lipiodol as a drug-delivery system for transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: A review. *Crit Rev Oncol Hematol* 88, 530–549
- Ioannou M, Paraskeva E, Baxevanidou K, Simos G, Papamichali R, Papacharalambous C, Samara M, Koukoulis G (2015): HIF-1 α in colorectal carcinoma: review of the literature. *J BUON* 20, 680–689
- Iwamoto S, Sanefuji H, Okuda K (2003): Angiographic subsegmentectomy for the treatment of patients with small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 97, 1051–1056
- Ji SK, Cho YK, Ahn YS, Kim MY, Park YO, Kim JK, Kim WT (2008): Multivariate Analysis of the Predictors of Survival for Patients with Hepatocellular Carcinoma Undergoing Transarterial Chemoembolization: Focusing on Superselective Chemoembolization. *Korean J Radiol* 9, 534–540
- Kalra AV, Kim J, Klinz SG, Paz N, Cain J, Drummond DC, Nielsen UB, Fitzgerald JB (2014): Preclinical activity of nanoliposomal irinotecan is governed by tumor deposition and intratumor prodrug conversion. *Cancer Res* 74, 7003–7013
- Kamphorst EJ, Bödeker H, Koroma S, Linnemann U, Berger MR (1999): New technique for superselective arterial (chemo-) embolization of the rat liver. *Lab Anim Sci* 49, 216–219
- Kato T, Nemoto R, Mori H, Takahashi M, Tamakawa Y, Harada M (1981): Arterial chemoembolization with microencapsulated anticancer drug. An approach to selective cancer chemotherapy with sustained effects. *JAMA* 245, 1123–1127
- Kemeny N, Huang Y, Cohen AM, Shi W, Conti JA, Brennan MF, Bertino JR, Turnbull ADM, Sullivan D, Stockman J, et al. (1999): Hepatic Arterial Infusion of Chemotherapy after Resection of Hepatic Metastases from Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 341, 2039–2048
- Kollmar O, Schilling MK, Menger MD (2004): Experimental liver metastasis: Standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin Exp Metastasis* 21, 453–460
- Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert-Koch-Institut (Hrsg.), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin 2015
- Kuo LJ, Yang L-X (2008): Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In *Vivo* 22, 305–309
- Lang G: Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik. 1. Auflage; Springer, Wien 2006
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-053OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>; Zugriff am 08.08.2017
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021-007OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>; Zugriff am 31.01.2017

- Lindell B, Aronsen KF, Nosslin B, Rothman U (1978): Studies in pharmacokinetics and tolerance of substances temporarily retained in the liver by microsphere embolization. *Ann Surg* 187, 95–99
- Mah L-J, El-Osta A, Karagiannis TC (2010): gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24, 679–686
- Marquet RL, Westbroek DL, Jeekel J (1984): Interferon treatment of a transplantable rat colon adenocarcinoma: importance of tumor site. *Int J Cancer* 33, 689–692
- Martignoni M, Groothuis GMM, de Kanter R (2006): Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2, 875–894
- Martin RCG, Joshi J, Robbins K, Tomalty D, Bosnjakovik P, Derner M, Padr R, Rocek M, Scupchenko A, Tatum C (2011): Hepatic Intra-Arterial Injection of Drug-Eluting Bead, Irinotecan (DEBIRI) in Unresectable Colorectal Liver Metastases Refractory to Systemic Chemotherapy: Results of Multi-Institutional Study. *Ann Surg Oncol* 18, 192–198
- Mathijssen RHJ, Alphen RJ van, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A (2001): Clinical Pharmacokinetics and Metabolism of Irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res* 7, 2182–2194
- Matsumura Y, Maeda H (1986): A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res* 46, 6387–6392
- McAuliffe JC, Qadan M, D'Angelica MI (2015): Hepatic resection, hepatic arterial infusion pump therapy, and genetic biomarkers in the management of hepatic metastases from colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 6, 699–708
- Memorial Sloan Kettering Cancer Center: About Your Codman® Implanted Liver Infusion Pump <https://www.mskcc.org/cancer-care/patient-education/about-your-codman-implanted-liver-infusion-pump>; Zugriff am 14.07.2017, letzte Aktualisierung der Seite: 02.01.2019
- Netzker R: Zellzyklus und molekulare Genetik. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (Hrsg.): *Duale Reihe Biochemie*. 3. Auflage; Thieme, Stuttgart 2012, 401–526
- PharmaCept: EmboCept® S <http://pharmacept.com/produkte/embocept-s-ubersicht/>; Zugriff am 18.04.2017
- Pieper CC, Meyer C, Vollmar B, Hauenstein K, Schild HH, Wilhelm KE (2015): Temporary Arterial Embolization of Liver Parenchyma with Degradable Starch Microspheres (EmboCept®S) in a Swine Model. *Cardiovasc Intervent Radiol* 38, 435–441
- Resch G, Thaler J (2011): Standards in den Stadien II, III und künftige Entwicklungen – Adjuvante Therapie des Kolonkarzinoms. *Spectr Onkol* 2, 12–14
- Richardson AJ, Laurence JM, Lam VWT (2013): Transarterial Chemoembolization with Irinotecan Beads in the Treatment of Colorectal Liver Metastases: Systematic Review. *J Vasc Interv Radiol* 24, 1209–1217
- S3-Leitlinie Hepatozelluläres Karzinom (2013): s. Leitlinienprogramm Onkologie

- S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom (2014): s. Leitlinienprogramm Onkologie
- Saenger J, Leible M, Seelig MH, Berger MR (2004): Chemoembolization of rat liver metastasis with irinotecan and quantification of tumor cell reduction. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**, 203–210
- Sato T, Tanaka T, Nishiofuku H, Fukuoka Y, Sakaguchi H, Masada T, Tatsumoto S, Marugami N, Takano M, Yamato I, et al. (2017): Pharmacokinetics and Histopathological Findings of Chemoembolization Using Cisplatin Powder Mixed with Degradable Starch Microspheres in a Rabbit Liver Tumor Model. *Cardiovasc Intervent Radiol* **40**, 438–444
- Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2004): Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 343–354
- Simiantonaki N, Taxeidis M, Jayasinghe C, Kurzik-Dumke U, Kirkpatrick CJ (2008): Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression increases during colorectal carcinogenesis and tumor progression. *BMC Cancer* **8**, 320
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76–85
- Sperling J, Schäfer T, Ziemann C, Benz-Weiber A, Kollmar O, Schilling MK, Menger MD (2012): Hepatic arterial infusion of bevacizumab in combination with oxaliplatin reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases. *Clin Exp Metastasis* **29**, 91–99
- Sperling J, Brandhorst D, Schäfer T, Ziemann C, Benz-Weißer A, Scheuer C, Kollmar O, Schilling MK, Menger MD (2013): Liver-directed chemotherapy of cetuximab and bevacizumab in combination with oxaliplatin is more effective to inhibit tumor growth of CC531 colorectal rat liver metastases than systemic chemotherapy. *Clin Exp Metastasis* **30**, 447–455
- Starkhammar H, Håkansson L (1987): Effect of starch microspheres on the passage of labelled erythrocytes and a low molecular weight marker through the liver. *Acta Oncol* **26**, 361–365
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2005): Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebserkrankungen <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Krebserkrankungen.html>; Zugriff am 02.02.2017
- Stefansson M, Nygren P (2016): Oxaliplatin added to fluoropyrimidine for adjuvant treatment of colorectal cancer is associated with long-term impairment of peripheral nerve sensory function and quality of life. *Acta Oncol* **55**, 1227–1235
- Sullivan RD, Norcross JW, Watkins E (1964): Chemotherapy of Metastatic Liver Cancer by Prolonged Hepatic-Artery Infusion. *N Engl J Med* **270**, 321–327
- Tanaka T, Nishiofuku H, Hukuoka Y, Sato T, Masada T, Takano M, Gilbert CW, Obayashi C, Kichikawa K (2014): Pharmacokinetics and antitumor efficacy of chemoembolization using 40 µm irinotecan-loaded microspheres in a rabbit liver tumor model. *J Vasc Interv Radiol* **25**, 1037–1044.e2
- The Human Protein Atlas: CASP3 <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000164305-CASP3/tissue>; Zugriff am 24.03.2017

The Human Protein Atlas: PECAM1

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000261371-PECAM1/tissue>; Zugriff am 23.03.2017

The Human Protein Atlas: PCNA

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000132646-PCNA/tissue>; Zugriff am 24.03.2017

Thomas C, Nijenhuis AM, Timens W, Kuppen PJ, Daemen T, Scherphof GL (1993): Liver metastasis model of colon cancer in the rat: immunohistochemical characterization. *Invasion Metastasis* **13**, 102–112

Wagner P, Boone B, Ramalingam L, Jones H, Zureikat A, Holtzman M, Ahrendt S, Pingpank J, Zeh H, Choudry H, Bartlett D (2015): Histologic and Immunohistochemical Alterations Associated with Cytoreductive Surgery and Heated Intraperitoneal Chemotherapy. *Ann Surg Oncol* **22 Suppl 3**, S588-595

Wallace S, Carrasco CH, Charnsangavej C, Richli WR, Wright K, Gianturco C (1990): Hepatic artery infusion and chemoembolization in the management of liver metastases. *Cardiovasc Intervent Radiol* **13**, 153–160

Wáng Y-XJ, De Baere T, Idée J-M, Ballet S (2015): Transcatheter embolization therapy in liver cancer: an update of clinical evidences. *Chin J Cancer Res* **27**, 96–121

Wang-Gillam A, Li C-P, Bodoky G, Dean A, Shan Y-S, Jameson G, Macarulla T, Lee K-H, Cunningham D, Blanc JF, et al. (2016): Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* **387**, 545–557

Xie R, Mathijssen RHJ, Sparreboom A, Verweij J, Karlsson MO (2002): Clinical Pharmacokinetics of Irinotecan and Its Metabolites: A Population Analysis. *J Clin Oncol* **20**, 3293–3301

Zhang H (2016): Onivyde for the therapy of multiple solid tumors. *Onco Targets Ther* **9**, 3001–3007

Zhang Z, Wang M, Zhou L, Feng X, Cheng J, Yu Y, Gong Y, Zhu Y, Li C, Tian L, Huang Q (2015): Increased HMGB1 and cleaved caspase-3 stimulate the proliferation of tumor cells and are correlated with the poor prognosis in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **34**, 51

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW (1999): Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* **59**, 5830–5835

Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Ghadimi für die Überlassung des interessanten Themas und für die Bereitstellung aller nötigen Materialien und des Arbeitsplatzes danken.

Von Herrn Dr. Jens Sperling wurde ich herzlich und unkompliziert in die Arbeitsgruppe aufgenommen. Seine ebenso qualifizierte wie motivierende wissenschaftliche Begleitung war mir eine besondere Hilfe bei der Erstellung meiner Arbeit. Herzlichen Dank!

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Anne Kauffels-Sprenger für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit. Durch Ihr unermüdliches Engagement und Ihre Geduld hat sie bedeutend zur Durchführung und Fertigstellung beigetragen. Sie hatte stets ein offenes Ohr für meine Probleme und Ideen. Unsere wissenschaftlichen und freundschaftlichen Gespräche haben meine Zeit während der Durchführung dieser Arbeit sehr geprägt. Vielen Dank, dass ich Teil deines Projekts sein durfte!

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Birgit Jünemann für das Anfertigen der histologischen und immunhistochemischen Schnitte bedanken. Ohne ihr unermüdliches Durchhaltevermögen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Das gesamte Team des Labors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Dr. Melanie Spitzner, Jessica Eggert, Johanna Buschalsky und Chan-Rong Lai, hat zum Zustandekommen und zum Erfolg meiner Arbeit bedeutend beigetragen. Sie standen mir bei allen Methoden, Fragen und Fehlern mit Rat und Tat zur Seite. Danke!

Bei Herrn Dr. Hanibal Bohnenberger darf ich mich für die Hilfe bei der Etablierung der immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Mein Dank gilt nicht zuletzt all denjenigen, die mir im letzten Jahren unterstützend zur Seite standen, stets ein offenes Ohr für meine Gedanken und Probleme hatten oder in den richtigen Momenten für Ablenkung sorgten. Danke schön!