

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie**

**Universität des Saarlandes**

**Homburg / Saar**

**Direktor: Prof. Dr. med. M.D. Menger**

**DIE HEPATO-ARTERIELLE INFUSION VON  
TEMSIROLIMUS INHIBIERT DAS TUMORWACHSTUM  
KOLOREKTALER LEBERMETASTASEN AUCH NACH  
WACHSTUMSSTIMULATION DURCH  
PFORTADERASTLIGATUR ODER LEBERTEILRESEKTION**

**Eine Untersuchung zur Wirkung von Temsirolimus an einem Metastasenmodell  
der Rattenleber**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes**

**2016**

**vorgelegt von**

**Anika Julia von Heesen**

**geb. Gittler**

**geboren am 14.02.1986 in Berlin-Charlottenburg**

Error! Use the Home tab to apply Überschrift 1 to the text that you want to appear here.

---

# **MEINEN ELTERN GEWIDMET**

# 1. INHALT

1. INHALT .....	2
2. ZUSAMMENFASSUNG .....	5
3. SUMMARY .....	7
4. EINLEITUNG .....	9
4.1. Kolorektales Karzinom .....	9
4.2. Lebermetastasen.....	10
4.3. Leberresektion .....	11
4.4. Pfortaderastligatur und -embolisation .....	12
4.5. Systemische Chemotherapie .....	14
4.6. Lokoregionäre Chemotherapie .....	15
4.7. Rapamycin und seine Derivate .....	18
4.7.1. Historie und Entwicklung.....	18
4.7.2. Biochemie und Pharmakologie .....	20
4.7.3. Klinische und Experimentelle Untersuchungen .....	24
5. ZIEL DER STUDIE .....	25
6. MATERIAL UND METHODEN .....	26
6.1. Versuchstiere .....	26
6.2. Tumorzellen .....	26
6.3. Temsirolimus (Torisel®).....	27

<b>6.4. Modell</b> .....	<b>28</b>
6.4.1. Tumorimplantation .....	28
6.4.2. Leberteilresektion .....	29
6.4.3. Pfortaderastligatur .....	30
6.4.4. Hepato-arterielle Infusion .....	31
<b>6.5. Kleintiersonographie</b> .....	<b>34</b>
<b>6.6. Hämatologische Parameter und Enzymaktivität</b> .....	<b>35</b>
<b>6.7. Histomorphologie</b> .....	<b>36</b>
6.7.1. Hämatoxylin-Eosin .....	36
6.7.2. AS-D Chloracetatesterase .....	37
<b>6.8. Immunhistochemie</b> .....	<b>38</b>
6.8.1. Apoptose .....	39
6.8.2. Proliferation .....	40
6.8.3. Vaskularisierung.....	41
<b>6.9. Experimentelles Protokoll</b> .....	<b>43</b>
6.9.1. Gewebeentnahme.....	45
<b>6.10. Datenerfassung und Statistik</b> .....	<b>46</b>
<b>7. ERGEBNISSE</b> .....	<b>47</b>
<b>7.1. Tumolvolumen</b> .....	<b>47</b>
<b>7.2. Körpergewicht</b> .....	<b>48</b>
<b>7.3. Hämatologische Parameter und Enzymaktivität</b> .....	<b>50</b>
<b>7.4. Histomorphologie</b> .....	<b>55</b>
7.4.1. Hämatoxylin-Eosin .....	55
7.4.2. AS-D Chloracetatesterase .....	57
<b>7.5. Immunhistochemie</b> .....	<b>58</b>

7.5.1. Apoptose .....	58
7.5.2. Proliferation .....	60
7.5.3. Vaskularisierung.....	62
<b>8. DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
<b>8.1. Diskussion von Material und Methoden .....</b>	<b>64</b>
8.1.1. Tumorimplantation .....	64
8.1.2. Chirurgische Präparation .....	66
8.1.3. Pfortaderastliagtur .....	66
8.1.4. Leberteilresektion .....	68
8.1.5. Hepato-arterielle Infusion .....	70
8.1.6. Temsirolimus .....	72
8.1.7. Untersuchungstechnik.....	74
<b>8.2. Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>76</b>
<b>8.3. Schlussfolgerung.....</b>	<b>81</b>
<b>9. LITERATUR .....</b>	<b>82</b>
<b>10. ANHANG .....</b>	<b>98</b>
<b>10.1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>11. DANKSAGUNG.....</b>	<b>103</b>
<b>12. PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>104</b>

## 2. ZUSAMMENFASSUNG

**Hintergrund:** Die hepato-arterielle Infusion (HAI) kann im Vergleich zur systemischen Applikation die Effektivität spezifischer Chemotherapeutika steigern. Aus diesem Grund untersuchten wir die Auswirkung einer HAI mit dem Rapamycinderivat Temsirolimus (CCI-779) auf das Wachstum kolorektaler Lebermetastasen in einem Rattenmodell, mit und ohne einer vorangegangenen Pfortaderastligatur oder Leberteileresektion.

**Material/Methoden:** Die Untersuchungen wurden an insgesamt 36 WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo from Rijswijk) Ratten vorgenommen. Die Tiere wurden in 6 Gruppen randomisiert (n=6/Gruppe) und erhielten eine Implantation syngener Kolonkarzinomzellen in den linken Leberlappen. Die Gruppen Rapa und Sham erhielten 10 Tage nach der Implantation eine HAI entweder mit Temsirolimus (Rapa) oder mit NaCl (Sham). In den Gruppen Phx Rapa und Phx Sham wurde eine 70%ige Leberresektion durchgeführt. Die Gruppen PBL Rapa und PBL Sham unterzogen sich einer Pfortaderastligatur. Diese Prozeduren wurden jeweils am Tag der Tumorimplantation vorgenommen (Tag 0). Die Tumorgöße wurde an Tag 10 und Tag 13 durch einen dreidimensionalen Ultraschall gemessen. An Tag 13 erfolgte dann die Organentnahme für die histologischen und immunhistochemischen Analysen.

**Ergebnis:** Von Tag 10 bis Tag 13 zeigte sich in den Kontrollgruppen ein gesteigertes Tumorwachstum, angeführt von der Phx Sham-Gruppe (+63.2±10.0%). Im Gegensatz dazu konnte das Tumorwachstum nach HAI mit Temsirolimus (Rapa: +0.5±7.7%) inhibiert werden. Nach Phx und PBL war das Tumorwachstum sogar signifikant reduziert (Phx Rapa: -8.3±13.1%; PBL Rapa: -1.1±4.7). Immunhistochemische Analysen zeigten nach Temsirolimus Behandlung eine gesteigerte Apoptose der Tumorzellen, sowie eine signifikante Reduktion der Tumovaskularisierung.

**Schlussfolgerung:** Eine hepato-arterielle Infusion mit Temsirolimus inhibiert das Tumorwachstum kolorektaler Lebermetastasen. Obwohl Phx und PBL einen Wachstumsreiz darstellen, wurde das Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe durch eine HAI mit Temsirolimus signifikant reduziert. Die Reduktion des Tumorwachstums wird durch einen anti-angiogenen Effekt mit Induktion von Tumorzellapoptose vermittelt.

### 3. SUMMARY

**Background:** Hepatic-arterial infusion (HAI) of specific chemotherapeutic agents is capable of increasing anti-tumour effects compared to systemic administration. Herein, we analysed the effect of a HAI of temsirolimus (CCI-779) in a rat model of colorectal liver metastases with or without performing hepatectomy (Phx) or portal branch ligation (PBL) before drug application.

**Materials/Methods:** Thirty-six WAG/Rij (Wistar Albino Glaxo from Rijswijk) rats were randomized in 6 groups (n=6 each). At the beginning, animals of all groups underwent subcapsular implantation of syngeneic colorectal cancer cells in the left liver lobe. After ten days animals received either a HAI of temsirolimus (Rapa) or saline solution (Sham). In two additional groups (Phx Rapa, Phx Sham) a 70 percent hepatectomy was performed. Two further groups (PBL Rapa, PBL Sham) underwent a portal branch ligation simultaneously. Tumour growth was analysed on day 10 and 13 by three dimensional ultrasound imaging. On day 13 animals were sacrificed and tissue was harvested for histomorphological and immunohistochemical analysis.

**Results:** From day 10 to day 13 controls showed an increased tumour growth, most pronounced in Phx Sham (+63.2±10.0%). In contrast, after HAI of temsirolimus the tumour growth was almost completely inhibited (Rapa: +0.5±7.7%) or even significantly reduced (Phx Rapa: -8.3±13.1%; PBL Rapa: -1.1±4.7). Histomorphological analyses revealed a decreased proliferation and an increased cleaved caspase-3 activity, which was associated with a significant reduction of PECAM-1-positive cells after HAI of temsirolimus.

**Conclusion:** HAI of temsirolimus inhibits tumour growth of colorectal liver metastases. Although Phx or PBL stimulates tumour growth compared to untreated tumour-bearing



livers, HAI of temsirolimus is capable of reducing tumour growth despite these growth stimulating procedures. Inhibition of tumour growth is provided by an anti-angiogenic effect with an induction of tumour cell apoptosis.

## **4. EINLEITUNG**

### **4.1. Kolorektales Karzinom**

In der westlichen Welt stellen nach den Herz-Kreislauf-erkrankungen maligne Tumorerkrankungen die häufigste Todesursache dar. Insgesamt ist das kolorektale Karzinom das vierthäufigste Karzinom [59]. Das Lebenszeit-Erkrankungsrisiko beträgt 5% mit jährlich mehr als 500.000 Todesfällen weltweit [9]. In Deutschland stellt das kolorektale Karzinom mit rund 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr das insgesamt zweithäufigste Malignom dar [111]. Das Auftreten und die Mortalität verdoppeln sich ab dem 50. Lebensjahr mit jeder Lebensdekade. Mit Hinblick auf die in Deutschland steigende Lebenserwartung ist in der Zukunft mit einem deutlichen Anstieg der Inzidenz zu rechnen [111]. Jährlich versterben rund 30.000 Patienten hierzulande an den Folgen eines kolorektalen Karzinoms [97]. 2010 war das kolorektale Karzinom die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland [27].

Malignome des Kolorektums treten sowohl sporadisch als auch erblich bedingt auf. Die sporadische Form, welche durch maligne Entartung von gutartigen Adenomen im Sinne der Adenom-Karzinom-Sequenz entsteht, ist die häufigste Form. Erblich bedingte Formen sind das hereditäre, nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), auch Lynch-Syndrom genannt, oder die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), eine obligate Präkanzerose. Diese machen ein Drittel aller kolorektalen Karzinome aus [46, 111].

## 4.2. Lebermetastasen

Der Metastasierungsgrad des Primärkarzinoms zum Zeitpunkt der Diagnose ist entscheidend für den Verlauf der Erkrankung. Bei rund 60% der Patienten mit kolorektalem Karzinom ist bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Metastasierung vorhanden. Die Leber ist in zwei Drittel der Fälle der häufigste Metastasierungsort. Bei Erstdiagnose des Rektumkarzinoms werden bei ca. 18% der Patienten Fernmetastasen diagnostiziert. Hiervon sind bei 15% die Leber und bei 4% die Lunge befallen. Die synchrone Fernmetastasierung des Kolonkarzinoms ist in 13%, und beim Rektumkarzinom in 12% der Fälle auf ein Organ beschränkt [64].

Der Metastasierungsweg in die Leber erfolgt durch eine hämatogene Streuung des Primärtumors über den venösen Abfluss in das Pfortadersystem [116]. Ohne Operation haben diese Patienten eine ungünstige Prognose [97]. Die einzige kurative Behandlungsoption bei Vorliegen von Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms ist die vollständige operative Entfernung der Metastasen [79]. Aus diesem Grund ist die R0-Resektion als wichtigster Prognosefaktor anzusehen. Unterstrichen wird dies durch die 5-Jahres-Überlebensrate von 25%-45% nach R0-Resektion [38, 49, 64, 73]. In einer Metaanalyse von 2003 zeigten Konopke und Saeger, dass die Überlebenszeiten nach R1 und R2-Resektion deutlich schlechter sind, und sich zudem kaum voneinander unterscheiden [59]. Laut Flieger et al. sind bei 75% der Patienten zudem beide Leberlappen befallen [37]. Faktoren wie Größe, Anzahl und Lokalisation der Lebermetastasen können einen operativen Eingriff unmöglich machen [100]. Achtzig Prozent der Betroffenen werden zum Zeitpunkt der Diagnose aus diesem Grund als primär nicht resezierbar eingestuft [83]. Den AWMF-Leitlinien von 2013 zu Folge gilt eine Metastase als resektabel, wenn weniger als 70% des Parenchyms reseziert werden muss, keine Leberinsuffizienz, Child B- oder C-Zirrhose bestehen, keine schwerwiegenden Begleiterkrankungen vorliegen und eine nicht resektable extrahepatische Manifestation ausgeschlossen ist [64, 97]. Unbehandelt liegt die

Überlebenszeit von Patienten mit Lebermetastasen bei einem Median von weniger als 10 Monaten, wobei der Großteil der Patienten infolge der hepatischen Metastasierung an einem Leberversagen verstirbt [59].

### **4.3. Leberresektion**

In den frühen siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts veröffentlichten Adson und Kollegen als Erste eine Studie, die deutlich machte, dass durch vollständige Resektion von kolorektalen Lebermetastasen ein Benefit für die Patientin erzielt werden kann. Von 32 Patienten, welche reseziert wurden, lebten nach 3 Jahren noch 41% gegenüber 0% in der Gruppe der nicht resezierten Patienten. Seitdem hat sich die Resektion kolorektaler Lebermetastasen als Goldstandard etabliert. Die Indikation zur Operation hängt von der Möglichkeit der R0-Resektion und dem verbleibenden Restlebertvolumen ab [38, 73]. Obwohl sich das Gesamtüberleben nach kurativer Resektion mit den Jahren verbessert hat, erleiden immer noch zwei Drittel der Patienten ein Rezidiv, wovon bei der Hälfte erneut die Leber betroffen ist [5]. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass häufig außer dem resezierbaren Befund ein weiterer, nicht-detektierter Befund vorliegt [80]. Zudem bewirkt die Resektion von Leberparenchym eine Freisetzung von lokalen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die zur Proliferation aller hepatischen Anteile und zur Regeneration der Leber bis zur Ausgangsgröße führt [35]. Hierdurch kann sowohl intra- als auch extrahepatisches Wachstum von Metastasen stimuliert werden [77, 80, 94]. In einer Studie an 26 Patienten zeigte sich bereits 19 Monate nach Resektion bei 42% ein Rezidiv, das mit erhöhten Werten an endothelialen Wachstumsfaktoren im Plasma verbunden war [118]. Bei ausgedehnten Resektionen korreliert das Tumorstadium mit dem Resektionsvolumen, wie Rupertus et al. in tierexperimentellen Studien zeigen konnten [93, 94]. Durch ausgedehnte Resektionen kann also das Wachstum von Mikrometastasen stimuliert

werden. Hier fehlen Therapieansätze, um das Neuauftreten von Metastasen nach erfolgreicher Resektion zu reduzieren.

#### **4.4. Pfortaderastligatur und -embolisation**

Eine kurative Behandlung bei Patienten mit Lebermetastasierung durch primäre Resektion ist nur bei einem geringen Prozentsatz von ca. 10% möglich [83]. In einigen Fällen ist die Resektion von einer oder mehreren Metastasen zwar aus chirurgischer Sicht durchführbar, scheitert jedoch an einem zu geringen Anteil an postoperativ verbleibendem Lebergewebe. Ausgedehnte Leberresektionen von über 75% können mit einer inadäquaten Regenerationsreserve des verbleibenden Parenchyms assoziiert sein. Folgen wie hepatische Insuffizienz führen zu einer erhöhten Mortalität [56, 69]. Bei Patienten mit bereits vorgeschädigtem Lebergewebe durch Zirrhose, Steatose, Cholestase, chronischer Hepatitis, oder neoadjuvanter Chemotherapie wird auf Grund der Funktionseinschränkung, abhängig vom Grad der Vorschädigung, ein deutlich größeres verbleibendes Lebervolumen benötigt [67].

Im Jahre 1920 konnten Rous und Larimore in einem tierexperimentellen Versuch an Kaninchen zeigen, dass die Ligatur eines Pfortaderastes sowohl zu einer ipsilateralen Atrophie im Versorgungsgebiet, als auch zu einer Hypertrophie des kontralateralen Leberlappens führt [91]. Diese Methode hat sich über die Jahre im klinischen Alltag etabliert. Man unterscheidet heute die Portalvenen-Embolisation (PVE) und die -Ligatur (PBL). Für die Portalvenen-Embolisation gibt es zwei etablierte Techniken. Zum einen über einen perkutanen transhepatischen Zugang (PTPE), zum anderen über einen transileocolischen Zugang (TIPE). Bei der PTPE wird der betreffende Portalvenenast unter Ultraschallkontrolle direkt perkutan punktiert und anschließend für die Applikation des Embolisats katheterisiert. Bei der TIPE wird die ileocolische Vene nach erfolgter Laparotomie des narkotisierten Patienten kanüliert. Anschließend

wird der Katheter antegrad bis zum Portalvenenast eingeschwemmt [67]. In einer retrospektiven Studie verglichen Boering et al. 2002 das Verfahren der Ligatur und Embolisation miteinander und fanden heraus, dass mit der PVE eine signifikant größere Volumenzunahme erzielt werden konnte als durch die Ligatur (188ml vs. 123ml). Auch der durchschnittliche Krankenhausaufenthalt war bei PVE kürzer (4.0 Tage vs. 8.1 Tage) [15]. Abgesehen von den operativen Risiken, der benötigten Vollnarkose und postoperativen Adhäsionen, haben Laparotomie-assoziierte Verfahren (Ligatur und TIPE) jedoch Vorteile: Die Laparotomie erlaubt gegebenenfalls eine sofortige Resektion von Lebermetastasen und gibt dem Operateur die Möglichkeit, sowohl die hepatische und extrahepatische Tumorausbreitung, als auch die Leberparenchymqualität visuell, taktil oder mittels intraoperativem Ultraschall zu beurteilen. Elias et al. veröffentlichten 2002 [31] eine Studie, die das Langzeitüberleben der Portalvenenembolisation und nachfolgender Resektion mit dem Outcome der primären Resektion vergleicht. Von September 1987 bis September 2000 wurde bei 68 Patienten eine PVE durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass bei 88% eine sekundäre Resektion durchgeführt werden konnte. Die durchschnittliche Volumenzunahme innerhalb eines Monats nach PVE lag bei 13%. Bei den Patienten mit Metastasen kolorektalen Ursprungs (68%) wird über ein 5-Jahres-Überleben von 37% berichtet, verglichen mit fast identischem 5-Jahres-Überlebensraten von 38% nach primärer Resektion [31]. In einer umfassenden Metaanalyse von Abulkhir (2008) mit 1088 Patienten zeigten sich vergleichbare Ergebnisse [2]. Nach PVE war bei 71% der Patienten eine sekundäre ausgedehnte Leberresektion möglich. Die errechnete Volumenzunahme des Parenchyms lag zwischen 8% und 27% [2].

Die Frage, ob die Pfortaderastligatur bzw.-embolisation und der damit verbundene Wachstumsreiz ein beschleunigtes Metastasenwachstum in der Leber induziert, evaluierten de Graaf et al. in einer Übersichtsarbeit von 2009. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass eine PVE zu einem beschleunigten Tumorwachstum sowohl im

ligierten als auch im nicht-ligierten Teil der Leber führt [11, 24]. Diese Tatsache kann die Durchführung einer sekundären Resektion wiederum unmöglich machen.

Zusammengefasst wird deutlich, dass die Pfortaderastligatur eine gute Option für Patienten mit Funktionseinschränkung oder ausgedehnter unilobulärer Lebermetastasierung darstellt, um eine sekundärer Resektion erzielen zu können. Es bleibt jedoch das Problem des dadurch induzierten Wachstumsreizes. Somit ist es notwendig, eine Therapieoption zur Hemmung des Tumorwachstums nach Pfortaderastligatur zu etablieren.

## **4.5. Systemische Chemotherapie**

Die Behandlungsoptionen des metastasierten kolorektalen Karzinoms sind durch die Einführung neuer Chemotherapeutika wie Irinotecan und Oxaliplatin, der oralen 5-Fluorouracil Prodrugs und später der biologischen Substanzen deutlich verbessert worden. Als Therapieoptionen stehen für die Erstlinientherapie Monotherapien und fluoropyrimidinbasierte Kombinationstherapien mit Oxaliplatin und/oder Irinotecan zur Verfügung. Die Wahl des Therapieregimes orientiert sich dabei am jeweiligen Therapieziel, d.h. Erreichen einer kompletten oder partiellen Remission und möglicherweise sekundären Resektabilität, oder Erreichen der Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens bei guter Lebensqualität [64].

So konnte in den letzten Jahren die durchschnittliche Überlebenszeit der Patienten im metastasierten Stadium eines kolorektalen Karzinoms von 10 auf 20 Monate verlängert werden [37]. Allerdings stellt die alleinige Chemotherapie immer noch eine palliative Maßnahme dar, mit der bislang keine Heilung erzielt werden kann.

Seit den späten achtziger Jahren bis 2002 war die Kombination aus Fluorouracil und Leucovorin der Standard der palliativen Therapie. Präparate wie Oxaliplatin, Irinotecan, Capecitabin und die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Bevacizumab konnten das Gesamtüberleben verbessern [51]. Aufgrund der höheren Ansprechraten konnte im Bereich der neoadjuvanten Therapie bei einem Teil der Patienten eine sekundäre Resektion der Lebermetastasen in kurativer Intention erfolgen [65]. Sowohl Adam et al. [3] als auch Giacchetti et al. [40] haben in einer retrospektiven Studie die Wirkung einer neoadjuvanten Gabe von Fluoropyrimidin/Leucovorin und Oxaliplatin beschrieben. Laut Giacchetti et al. konnte von initial 151 Patienten, bei denen die Metastasen als nicht resezierbar eingestuft waren, bei 58 (38%) eine sekundäre Resektion in kurativer Absicht erfolgen [40]. Im Gegensatz dazu konnten bei Adam et al. nur 14% der Betroffenen sekundär reseziert werden [3]. Trotz der Anwendung verschiedener adjuvanter und neoadjuvanter Regime systemischer Chemotherapie liegt die mediane Überlebensrate in der Patientenpopulation mit nicht resezierbaren Lebermetastasen nach wie vor nur zwischen 12 und 18 Monaten [115]. Ziel ist es, diesen Patienten durch eine Chemotherapie eine sekundäre Leberteilresektion zu ermöglichen. Um Wirksamkeit und Ansprechen von Chemotherapeutika auf die Metastasen zu erhöhen, ist die Modifikation der Darreichungsform zur lokalen Dosiserhöhung in Form der lokoregionären Chemotherapie ein weiterer Therapieansatz.

## **4.6. Lokoregionäre Chemotherapie**

Die hepato-arterielle Infusion gehört, wie die transarterielle Chemoembolisation (TACE) und die selektive interne Radiotherapie (SIRT), zur Gruppe der regionären transarteriellen Therapieverfahren im Rahmen der Behandlung von primären und sekundären Lebertumoren. Die direkte arterielle Applikation von Zytostatika in die Leber bewirkt eine höhere intratumorale Wirkstoffkonzentration gegenüber der zentral



oder peripher venösen Applikation [19]. Systemische Nebenwirkungen eines Chemotherapeutikums können ebenfalls reduziert werden [102].

Die transarterielle Chemoembolisation ist ein Katheter basiertes, minimalinvasives Verfahren, bei dem die Applikation eines oder mehrerer Zytostatika mit gleichzeitiger Okklusion tumorversorgender Arterien der Leber kombiniert wird [111]. Bei der SIRT werden <sup>90</sup>Yttrium-markierte Mikrosphären über die Leberarterie appliziert. Das Yttrium erreicht so als beta-Strahler eine lokale Destruktion des Tumorgewebes [53, 111]. Diese Konzepte basieren auf der Besonderheit der dualen Blutversorgung der Leber [111]. Zum einen wird sie über die Pfortader mit dem nährstoffreichen Blut aus dem Abstromgebiet des Gastrointestinaltraktes versorgt, zum anderen erhält die Leber ihre arterielle Versorgung über die Arteria hepatica aus dem Truncus coeliacus. Bereits 1954 konnten Breedis und Young zeigen, dass Metastasen mit einem Durchmesser >2-3mm hauptsächlich über den arteriellen Schenkel versorgt werden, wohingegen das Leberparenchym seine nutritive Blutversorgung überwiegend über die Vena portae bezieht [14]. Basierend auf dieser Erkenntnis ist es Ziel der oben genannten Verfahren, bei Reduktion der systemischen Toxizität eine Steigerung der Konzentration und Expositionszeit im Tumor zu bewirken. Die hepato-arterielle Infusion perfundiert die Tumoreareale in der Leber so gezielter, kann jedoch auch zu einer Parenchymschädigung des übrigen Lebergewebes führen.

Das Modell der hepato-arteriellen Infusion wurde 1964 von Sullivan et al. [101] entwickelt. Sechzehn Patienten mit Lebermetastasen gastrointestinalen Ursprungs wurden mittels einer HAI behandelt. Zehn Patienten sprachen objektiv auf diese Therapie an und zeigten einen klinischen Benefit. Allerdings war diese Methode aufgrund der Applikationsweise noch mit häufigen Komplikationen behaftet [101]. Im Rahmen der Etablierung dieses Verfahrens wurden in den Studien Katheter benutzt, welche operativ oder perkutan in die Arteria hepatica implantiert, und an eine externe Infusionspumpe angeschlossen wurden. In der Folge kam es zu Thrombosen,

Blutungen, Infektionen und Katheterdislokation [33]. Daher ging man dazu über, den Katheter an einen subkutanen Port anzuschließen, was die Komplikationsrate jedoch nicht wesentlich reduzierte [28, 117]. Aufgrund stetiger Modifizierungen dieser Methode wurden in den späten siebziger Jahren implantierbare Infusionspumpen entwickelt, welche die Anzahl der Komplikationen deutlich reduzierten [107].

Cohen und Kemeny konnten in einer Metaanalyse, welche Studien von 1987 bis 2003 einbezog, einen Vorteil der hepato-arteriellen Infusion in Bezug auf Ansprechraten sowie auf die 2-Jahresüberlebensrate im Vergleich zur i.v. Chemotherapie zeigen [20]. Eine randomisierte klinische Studie von 2006 von Kemeny et al. [52] zeigte ebenfalls einen Benefit nach HAI im Vergleich zur systemischen Therapie. Zwischen Januar 1995 und Dezember 2000 wurden 135 Patienten mit initial isolierten, aber nicht resezierbaren Lebermetastasen in zwei Gruppen randomisiert und entweder mit einer HAI oder einer systemischen Applikation von Fluorouracil und Leucovorin behandelt. Es zeigte sich ein verlängertes mittleres Gesamtüberleben in der HAI-Gruppe (24,4 vs. 20,0 Monate). Des Weiteren wurden die Ansprechraten auf die Chemotherapie nach hepato-arterieller Infusion annähernd verdoppelt (47% vs. 24%). Signifikant schlechter fiel hingegen die durchschnittliche Dauer bis zum extrahepatischen Tumorprogress aus. Nach nur 7,7 Monaten zeigten die HAI-behandelten Patienten ein Rezidiv, während in der Kontrollgruppe erst nach 14,8 Monaten ein Rezidiv auftrat [52].

Kulaylat et al. [61] berichten in einer Übersichtsarbeit über den Einsatz der HAI im adjuvanten, neoadjuvanten und palliativen Bereich. Im klinischen Alltag stellen vor allem die Komplexität des Procedere, der zusätzliche chirurgische Eingriff, Katheterdislokation und die erhöhte Lebertoxizität ein Problem dar. Die Autoren empfehlen den Einsatz der HAI bei nicht-vorbehandelten Patienten mit isolierten, nicht resezierbaren Lebermetastasen als Zweitlinientherapie bei systemischer 5-FU Resistenz, bei einem erhöhten Rezidivrisiko als adjuvante Therapie nach Leberteilresektion, oder als zusätzliche Option multimodaler Therapieansätze [61].

## 4.7. Rapamycin und seine Derivate

### 4.7.1. Historie und Entwicklung

Die Klasse der Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Inhibitoren umfasst neben Rapamycin (Rapamune/Sirolimus, Wyeth Pharma, Münster, Deutschland) seine Derivate CCI779 (Temsirolimus, Torisel® Wyeth), RAD001/Everolimus (Novartis, Nürnberg, Deutschland) und das Analogon AP23573 (Deforolimus, ARIAD Pharmaceuticals, Frankfurt, Deutschland) [10].

Rapamycin wurde 1975 von Vézina aus einer Bodenprobe der Osterinsel (Rapa Nui) isoliert und ist ein makrozyklisches Lacton, welches von dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* aus der Klasse der Actinobakterien gebildet wird. Aufgrund seiner fungiziden Wirkung wurde Rapamycin als erstes als Antimykotikum gegen *Candida albicans* und Dermatophyten eingesetzt [108]. Trotz der bekannten antiproliferativen Wirkung von Rapamycin rückte die Forschung hierzu in den Hintergrund, als die Ähnlichkeit von Sirolimus zu dem Immunsuppressor Tacrolimus auffiel. Zahlreiche Untersuchungen bewiesen, dass Rapamycin inhibitorisch auf die T-Zell-Proliferation wirkt. Dies führte 1999 in den USA und ein Jahr später in Europa zur Markteinführung von Sirolimus als Immunsuppressivum nach Nierentransplantation [95]. Kauffman et al. beobachteten, dass Patienten, welche nach Transplantation Rapamycin zur Immunsuppression erhielten, im Vergleich zu Patienten, welche mit Cyclosporin A behandelt wurden, im Verlauf weniger Tumoren entwickelten [50].

Der Einsatz von Rapamycin (Sirolimus) war trotz dieser Erkenntnisse durch seine schlechten pharmakologischen Eigenschaften limitiert. Es zeigte sich eine geringe Wasserlöslichkeit, eine verminderte Bioverfügbarkeit sowie ein hoher hepatischer First-Pass-Effekt. Es erfolgte die Modifikation der molekularen Struktur von Rapamycin

[71]. Mit der Entdeckung des wasserlöslichen Temsirolimus zur intravenösen Applikation in den späten neunziger Jahren, erlebte Rapamycin mit seiner antiproliferativen Wirkung als mögliches zytotoxisches Therapeutikum erneut Beachtung [34]. Temsirolimus ist ein löslicher 42-[2,2-bis (hydroxymethyl)]-propinischer Ester von Rapamycin/Sirolimus mit einem Molekulargewicht von 1030.30 Dalton [23]. Alle Rapamycinderivate basieren auf der gleichen molekularen Struktur und besitzen die gleiche Bindungsstelle für das FK binding protein 12 (FKBP12) und den Mammalian Target of Rapamycin (mTOR). Durch die Substitution eines Carbonsäureesters (Abbildung 1) entsteht das wasserlösliche Derivat Temsirolimus zur intravenösen Anwendung. Temsirolimus kann als Prodrug von Rapamycin/Sirolimus bezeichnet werden, welches nach intravenöser Gabe CYP3A4-abhängig in Sirolimus biokonvertiert wird [34].

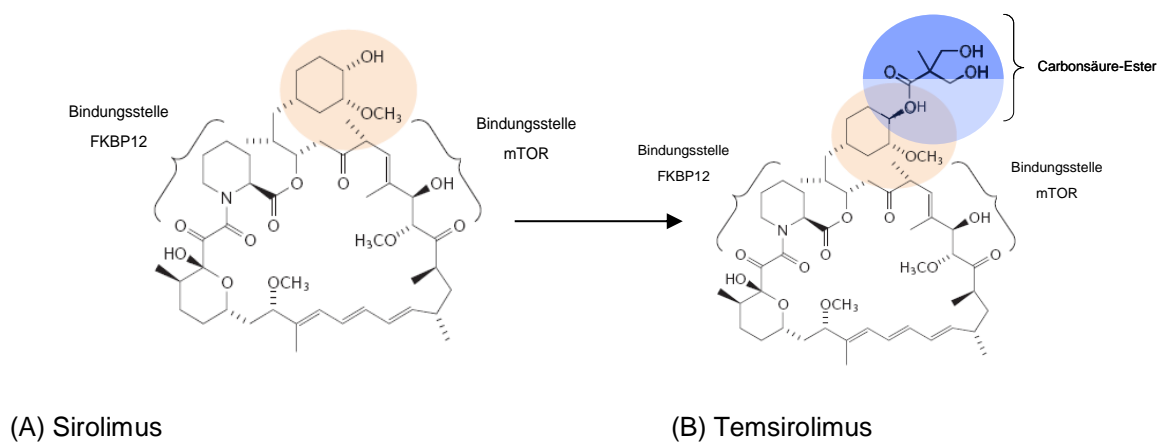


Abbildung 1: (A) Molekularstruktur Sirolimus, (B) Molekularstruktur Temsirolimus mit blau markiertem Carbonsäureester. Abbildung modifiziert nach: [33].

Im New England Journal of Medicine wurden 2007 die Ergebnisse der umfassenden ARCC-Studie (Global Trial for Advanced Renal Cell Carcinoma) publiziert, welche die Überlegenheit von Temsirolimus im Vergleich zu Interferon- $\alpha$  beim metastasierten

Nierenzellkarzinom deutlich machte. 626 Patienten mit schlechter Prognose erhielten im Rahmen dieser randomisierten Phase-III-Studie als „First-line-Therapie“ entweder Interferon- $\alpha$ , den bisherigen Standard, Temsirolimus oder eine Kombination beider Wirkstoffe. Die Temsirolimus-Monotherapie verlängerte das mediane Überleben um 3,7 Monate verglichen mit der Interferon- $\alpha$ -Monotherapie. Interessanterweise verlängerte die Kombinationstherapie das mediane Überleben lediglich um 1,1 Monate verglichen mit der Interferon- $\alpha$ -Monotherapie. Basierend darauf, erfolgte die Zulassung von Temsirolimus zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms in den USA und in Europa [47]. Ende Januar 2008 hat die europäische Zulassungsagentur für Arzneimittel (EMA) einer Zulassungserweiterung von Temsirolimus für die Therapie des rezidivierenden oder therapierefraktären Mantelzelllymphoms zugestimmt [8]. In klinischen Studien zeigte sich bei der intermittierenden Anwendung der Rapaloga -wie z.B. Temsirolimus als Zytostatika- anders als bei Sirolimus, keine manifeste Immunsuppression [109].

#### **4.7.2. Biochemie und Pharmakologie**

Rapamycin und seine Derivate binden intrazellulär an das FK-binding-protein-12 (FKBP12) und bilden einen Komplex, welcher den Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) inaktiviert. mTOR ist eine multifunktionale Serin-Theonin-Kinase und Mitglied der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase Familie. Aktiviert durch Stimulation von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen, welche an Rezeptoren der Zellmembran binden, agiert der mTOR als Schalter zwischen kataboler und anaboler Stoffwechsellage. Des Weiteren werden Translation-regulierende Faktoren aktiviert, welche letztlich die Proliferation und das Zellwachstum anregen. Im Gegensatz dazu kommt es bei mTOR-Inhibition zu einem Stillstand des Zellzyklus in der späten G1-Phase durch Herunterregulation des Cyklin-D1 und Akkumulation des Zellzyklus-Inhibitors p27 [29, 34, 119]. Zelltypen wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Tumorzellen sprechen

auf Rapamycin an [45]. Dieser Effekt führte zu einem breiten Spektrum an möglichen Anwendungsgebieten in der Transplantations- und Tumorthherapie sowie bei beschichteten Gefäßstents [29].

Rapamycin wirkt über die Blockade der Phosphatidylinositol-3-Kinase/ AKT (PI3/AKT)-Signaltransduktionskaskade (Abbildung 2). Wachstumsfaktoren und Cytokine, wie zum Beispiel der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) binden an die Rezeptor-Tyrosinkinasen der Zellmembran und aktivieren auf diesem Wege die Phosphatidylinositol-3-Kinase. Über die Produktion von Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP3) wird AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene) aktiviert. PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10) reguliert die PI3-Kinase/AKT-Signalkaskade negativ durch den Abbau von PIP3. Im Rahmen der Onkogenese kann es zu einem Wirkverlust von PTEN und somit zur fehlenden Feedback-Hemmung kommen. Dies führt zu einer gesteigerten Proliferation und zur unkontrollierten Zellvermehrung. AKT phosphoryliert wiederum TSCII (tuberose sclerosis complex II) und inaktiviert dadurch den TSCI/TSCII-Komplex, der mTOR hemmt.

Der mammalian Target of Rapamycin (mTOR) besteht aus zwei Untereinheiten, dem Rapamycin-sensitiven mTORC1 (Raptor = regulatory associated protein of mTOR) und dem Rapamycin-insensitiven mTORC2 (Rictor = rapamycin-insensitive companion of mTOR). Der mTOR-Komplex 1 (mTORC1) besteht aus mTOR, dem Raptor und dem mammalian LST8/G-Protein (mLST8). Aktiviert führt dieser Komplex zu einer Phosphorylierung der Translationsfaktoren eucaryotic-initiation-factor (4E-BP1) und protein-70-S6-kinase-1 (p70S6K). Dies bewirkt eine Steigerung der intrazellulären Produktion von Schlüsselproteinen, die für Zellwachstum und Angiogenese verantwortlich sind. Um diesen „downstream“-Effekt von mTOR zu erzielen, muss TORC1 an mTOR gebunden sein. Rapamycin und seine Derivate, z.B. Temsirolimus greifen hier ein, zerstören diesen mTOR/raptor-Komplex und führen

somit zu seiner Inaktivierung. Der mTORC-Komplex-2 besteht aus mTOR, Rictor (Rictor = rapamycin-insensitive companion of mTOR), und mammalian-stress-activated-protein-kinase-interacting-protein-1 (mSIN1). Der mTORC-Komplex-2 reguliert die Dynamik des Zytoskeletts und kann zudem AKT aktivieren. Der mTOR-Komplex-2 kann im Gegensatz zu mTOR-Komplex-1 nicht durch Rapamycin und seine Derivate gehemmt werden [23].

Dysregulationen der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade sind Auslöser für eine Vielzahl von Karzinomen. Die Onkogenese des kolorektalen Karzinoms ist multifaktoriell, die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade spielt jedoch eine zentrale Rolle. Durch eine K-RAS-Mutation (V-Ki-ras2 = Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) erfolgt eine gesteigerte exogene Aktivierung der Signalkaskade. Endogene Auslöser sind z.B. eine Überexpression von AKT oder ein Verlust von PTEN. Dies führt wie bereits beschrieben zu einer Steigerung von Proliferation und Angiogenese der betroffenen Zelle. Ziel der Klasse der mTOR-Inhibitoren ist es die Aktivierung der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade zu hemmen und so eine Inhibierung von Tumorzellproliferation zu bewirken [23, 34].

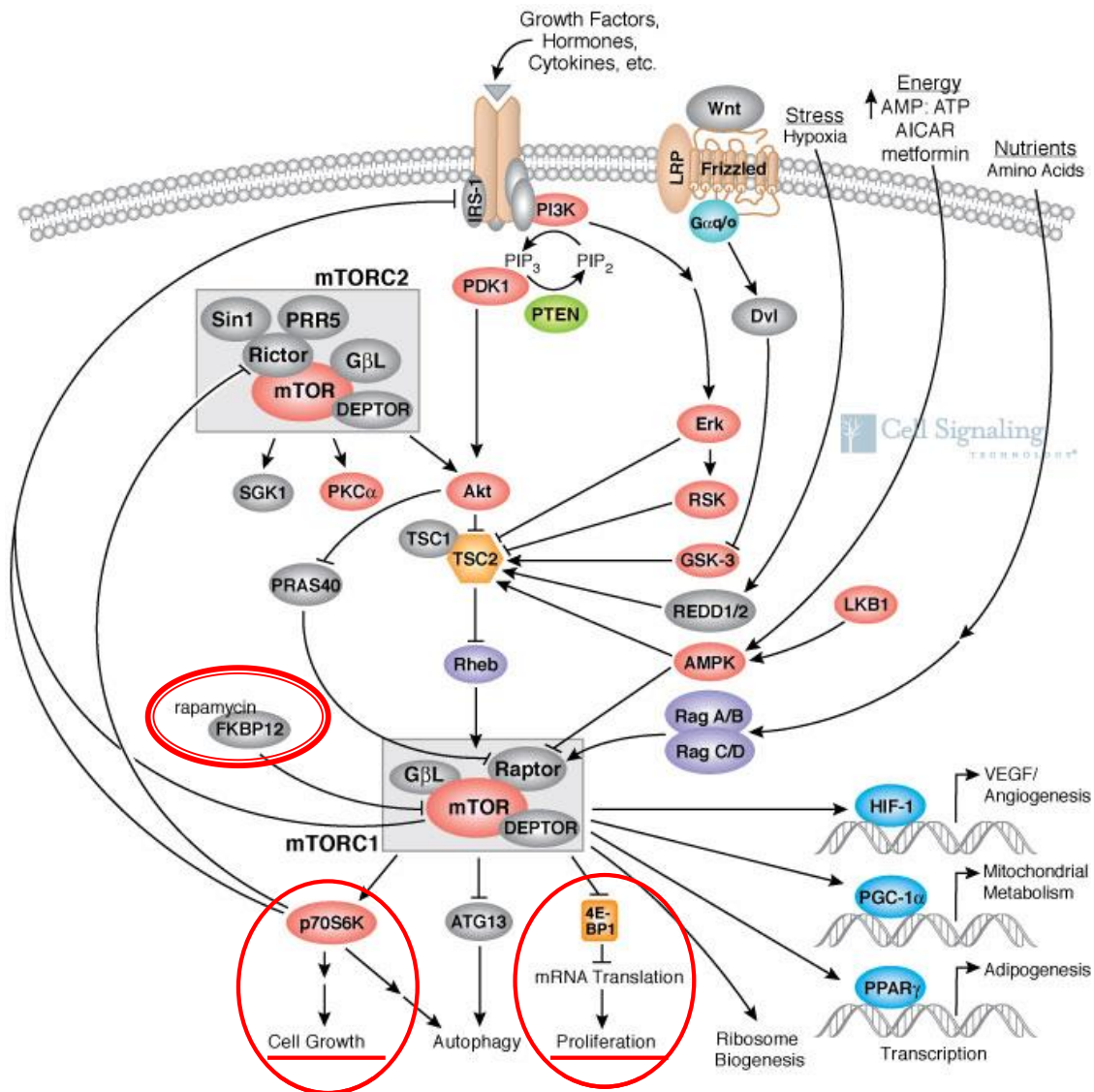


Abbildung 2: Zeigt die PIP3/AKT Signalkaskade, der mTOR-Komplex steuert Zellwachstum und -überleben. Rapamycin hemmt spezifisch den mTOR-Komplex-1 [mTORC1, doppelte rote Umrandung]: Rapamycin bindet selektiv an FKBP12 [rote Umrandung: „downstream“-Mediatoren p70S6K und 4E-BP1, Faktoren für Zellwachstum und Proliferation]; Abbildung modifiziert nach <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/mTor.html>.



### **4.7.3. Klinische und Experimentelle Untersuchungen**

Die Wirkung von Rapamycin und seiner Derivate auf verschiedene Tumoren und die mögliche Reduktion des Wachstums wurden in zahlreichen experimentellen und klinischen Studien evaluiert. Ein antiproliferativer Effekt von Rapamycin wird zum einen für verschiedene solide Tumoren, wie z.B. Nierenkarzinome, neuroendokrine Tumoren des Pankreas, Sarkome, Lebertumoren und das kolorektale Karzinom, zum anderen für nicht-solide Tumoren wie das Non-Hodgkin-Lymphom beschrieben [112].

Mehrere klinische Studien berichten allerdings über eine erhöhte Rate an thromboembolischen Komplikationen, welche mit dem Einsatz von Rapamycin und seiner Derivate assoziiert sind [12, 105]. In diesen Studien wurden Rapamycin und seine Derivate aber stets systemisch gegeben. Bekannt ist, dass lokoregionale Applikationsformen wie die hepato-arterielle Infusion im Vergleich zur systemischen Gabe die lokale Wirkung verschiedener Zytostatika bei zeitgleich geringerem Nebenwirkungsprofil erhöhen kann [112].

## 5. ZIEL DER STUDIE

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung des mTOR-Inhibitors Temsirolimus im Rahmen einer hepato-arteriellen Infusion an einem Lebertumormodell in WAG/Rij-Ratten untersucht.

Ziel der Studie war es:

- a) Die Wachstumsinduktion kolorektaler Lebermetastasen durch Pfortaderastligatur und Leberteileresektion zu analysieren.
- b) Die wachstumshemmende Wirkung einer hepato-arteriellen Infusion des mTOR-Inhibitors Temsirolimus auf etablierte kolorektale Lebermetastasen zu beurteilen.
- c) Die wachstumshemmende Wirkung einer hepato-arteriellen Infusion des mTOR-Inhibitor Temsirolimus auf etablierte kolorektale Lebermetastasen nach vorangegangener Wachstumsinduktion durch Pfortaderastligatur und Leberteileresektion zu evaluieren.
- d) Die Auswirkung einer hepato-arteriellen Infusion des mTOR-Inhibitor Temsirolimus auf das Leberparenchym zu analysieren.

## **6. MATERIAL UND METHODEN**

### **6.1. Versuchstiere**

Insgesamt dienten 36 männliche WAG-RIJ-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) als Versuchstiere. Während der Experimente wurden die Tiere unter standardisierten Bedingungen (Lufttemperatur: 22°C, relative Luftfeuchtigkeit: 55%, +/- 10%) mit einem Hell-, Dunkelrhythmus von 12 Stunden in konventioneller Tierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar gehalten. Das durchschnittliche Körpergewicht betrug 345g. Gefüttert wurden die Versuchstiere mit Standardlaborfutter (Fa. Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum.

### **6.2. Tumorzellen**

Die verwendeten CC531 Tumorzellen sind Zellen eines syngenem kolorektalen Karzinoms (CLS; Cell Lines Service and Tumor Cellbank; Heidelberg, Deutschland). Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -180°C in 1,8ml Gefäßen (Nunc, Roskilde, Dänemark) kryokonserviert. Zur anschließenden Kultivierung wurden die Kryogefäße zunächst in 37°C warmem Wasser aufgetaut, dann mit 70% Isopropanol-Lösung desinfiziert. Die aufgetauten Zellen wurden anschließend in ein 50ml Zentrifugenröhrchen (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit vorgelegtem, Raumtemperatur-angeglichenem, FCS-haltigem Kulturmedium (FCS; Foetal calf serum; Gold, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) überführt. Nach zwei Zentrifugationsdurchläufen (Universal 30F; Hettich, Tuttlingen, Deutschland) à 5 Minuten bei 1600U/min konnten die Zellen in Petrischalen (Cellstar; 100/20mm,

Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und bei 37°C unter einer 5%igen humiden CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, PAA Laboratories GmbH, Deutschland) kultiviert werden. Im zweitägigen Rhythmus erfolgte ein Medienwechsel. Bei einer Zellkonfluenz von ca. 70-80% wurden die Zellen zur weiteren Vermehrung passagiert.

Für die anschließende Injektion wurden die Zellen zunächst mit 0,02%iger Trypsin/EDTA-Lösung (0,5g/l; 0,2g/l; Virolex; PAA Laboratories GmbH, Deutschland) sowie Accutase (PAA Laboratories GmbH, Deutschland) versetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37°C wurde die Enzymwirkung mit FCS-haltigem Kulturmedium neutralisiert, der Zellansatz durch 5-minütige Zentrifugation bei 1600U/min gereinigt und das Sediment zweimal mit PBS (phosphate buffered solution; PAA Laboratories GmbH, Deutschland) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 ausgedünnt und bis zum nächsten 70-80%igem Konfluenz kultiviert. In der zweiten Passage wurden die Zellen auf 1:4 bis 1:5 ausgedünnt und am zweiten Tag nach Passagierung für die Experimente eingesetzt. Die vorgegebene Injektionsmenge von  $5 \times 10^5$  Zellen wurde durch Zellzählung mit einem inversen Lichtmikroskop (Leica DMIL, Solms, Deutschland) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

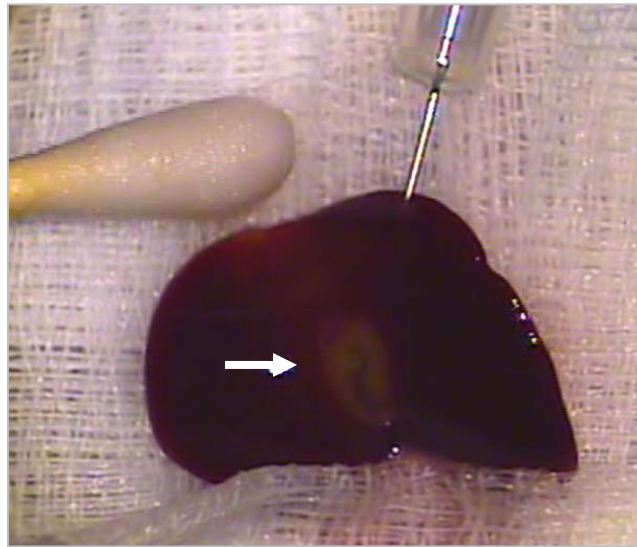
### **6.3. Temsirolimus (Torisel®)**

Das verwendete Medikament war Temsirolimus (Torisel® Pfizer; Berlin, Deutschland). Die behandelten Versuchstiere erhielten jeweils eine Dosis von 0,3mg/kg Körpergewicht Torisel® über eine hepato-arterielle Infusion. In den Kontrollgruppen (Sham) wurde eine vergleichbare Menge 0,9%iger Kochsalzlösung verabreicht.

## **6.4. Modell**

### **6.4.1. Tumorimplantation**

Zur Durchführung der Tumorimplantation und der anderen Versuchsschritte wurden die Tiere mittels einer inhalativen Narkose mit einem Gemisch aus Isofluran/Sauerstoff (Isofluran; Baxter GmbH, Unterschleißheim, Deutschland; Sauerstoff medical 100%, Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland) mit einem Isofluran-Anteil von 5% bei einem Sauerstofffluss von 1000ml/min narkotisiert. Anschließend wurden die Tiere gewogen (Waage ADE, Hamburg, Deutschland) und dann für die Laparotomie abdominell rasiert (Electra GH 204; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland). Nach Eröffnung des Situs über eine mediane Laparotomie wurden die vorbereiteten CC531-Tumorzellen ( $5 \times 10^5$  Zellen) mittels einer 27G Kanüle (Omnicon F; Braun, Melsungen, Deutschland) subkapsulär in die dorsale Seite des linken Leberlappens injiziert. Für die Fixation des Leberlappens während des Injektionsvorganges wurden feuchte Wattestäbchen benutzt (Abbildung 3). Nach Blutstillung durch leichten Druck eines ausgezogenen Wattestäbchens auf die Injektionsstelle wurde der Leberlappen vorsichtig wieder in seine anatomisch korrekte Lage gebracht. Die Adaption der Wundränder zum Verschluss der Laparotomie erfolgte mittels einschichtig fortlaufender Hautnaht (Prolene 3-0; Ethicon /Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland).



*Abbildung 3: Das Bild zeigt die subkapsuläre Injektion der Tumorzellen in den linken Leberlappen mittels einer 27G Kanüle (weißer Pfeil). Das feuchte Wattestäbchen dient dazu, den Leberlappen auf einer Schlitzkomresse zu positionieren.*

An Tag 0 wurde zudem in den Phx-Gruppen eine 70%ige Leberteileresektion durchgeführt. In den PBL-Gruppen erfolgte eine Pfortaderastligatur des Tumortragenden linken Leberlappens.

## **6.4.2. Leberteileresektion**

Nach der Tumorzellimplantation wurde die mediane Laparotomie nach kaudal erweitert und die Leberlappen vorsichtig mobilisiert. Reseziert wurden der intermediäre und der rechte Leberlappen sowie der Lobus processus caudatus. Die portalvenösen Äste wurden stammnah nach Ligatur (Vicryl 4-0, Ethicon/Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) des Gefäßstiels disseziert. Hierauf folgte die Parenchymdurchtrennung mit einer Präparierschere. Im Anschluss erfolgte nach suffizienter Blutstillung der Wundverschluss mittels einschichtig fortlaufender Hautnaht

(Prolene 3-0, Ethicon/Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland)  
(Abbildung 4).

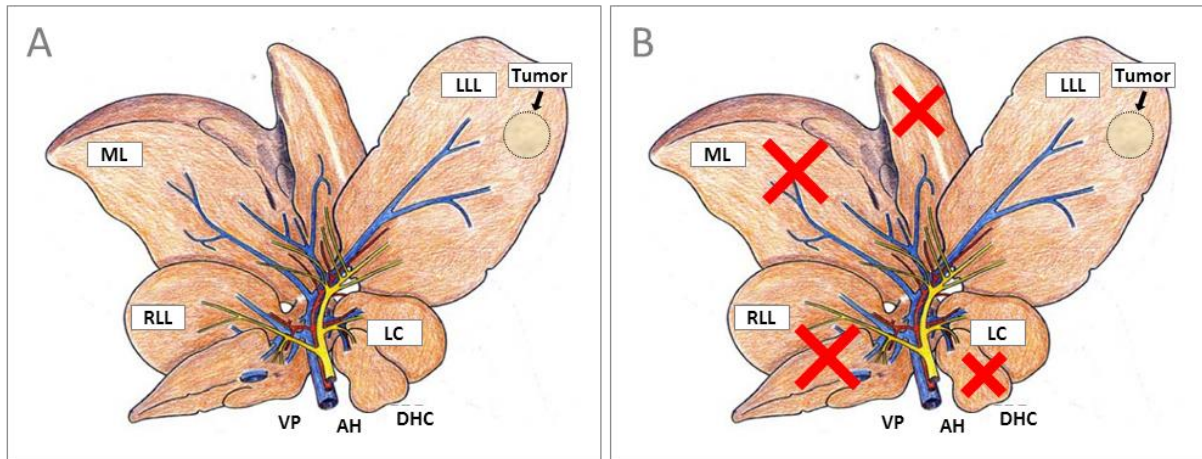


Abbildung 4: A und B: Schematische Zeichnung der kleeblattförmig gelappten Rattenleber mit Gefäßarchitektur. Der schwarze Pfeil markiert den Tumor im linken Leberlappen (gelber Kreis mit schwarz gestrichelter Umrandung). ML = Mittellappen, LLL = Linker Leberlappen, RLL = rechter Leberlappen und LC = Lobus caudatus. Leberhilus: gelb: DHC= Ductus hepaticus communis; rot: AH = Arteria hepatica; blau: PV = Vena portae  
(B) Die roten Kreuze markieren die resezierten Leberlappen der Phx-Gruppen.  
Abbildung modifiziert nach [5].

### 6.4.3. Pfortaderastligatur

Bei den PBL-Gruppen erfolgte an Tag 0 eine Pfortaderastligatur des tumortragenden Lappens im Anschluss an die Injektion der CC531-Zellen. Nach Erweiterung der Laparotomie wurde der linke Leberlappen vorsichtig nach Durchtrennung der Haltebänder der Leber mit mikrochirurgischen Instrumenten (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) unter einem Operationsmikroskop (Typ 384000, Wild Heerburg, Schweiz) mobilisiert. Der Pfortaderast des linken Leberlappens wurde dargestellt, mit 6-0 Seide (Resorba; Nürnberg, Deutschland) angeschlossen und im Anschluss ligiert. Während der chirurgischen Präparation wurde besonders darauf

geachtet, die A. hepatica sinistra sowie den zugehörigen Gallengang unversehrt zu lassen. Ligiert wurde das Pfortadergefäß des Lobus sinister lateralis und des Processus papillaris (Abbildung 5). Als Erfolgskontrolle diente die livide Verfärbung des zuvor hellroten Lebergewebes nach durchgeführter Ligatur. Gleichzeitig konnte so auch ein versehentlicher Verschluss weiterer Äste der Vena portae ausgeschlossen beziehungsweise überprüft werden.

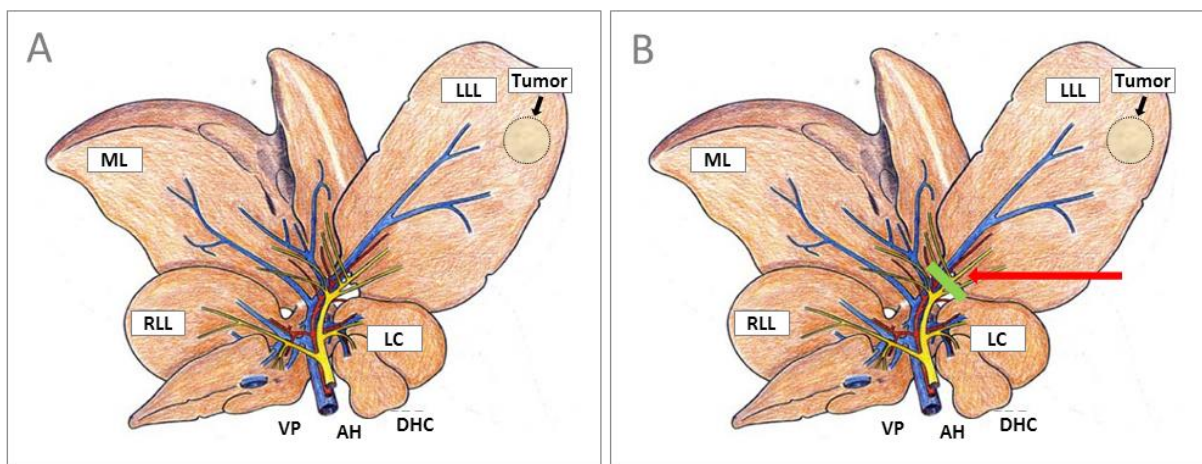


Abbildung 5: A und B: Schematische Zeichnung der kleeblattförmig gelappten Rattenleber mit Gefäßarchitektur. Der schwarze Pfeil markiert den Tumor im linken Leberlappen (gelber Kreis mit schwarz gestrichelter Umrandung). ML = Mittellappen, LLL = Linker Leberlappen, RLL = rechter Leberlappen und LC = Lobus caudatus. Leberhilus: gelb: DHC = Ductus hepaticus communis; rot: AH = Arteria hepatica; blau: VP = Vena portae (B) Der grüne Balken zeigt die Ligatur des linken Pfortaderastes (roter Pfeil).  
Abbildung modifiziert nach [5].

#### 6.4.4. Hepato-arterielle Infusion

An Tag 10 nach Tumorzellimplantation wurde die hepato-arterielle Infusion von Temsirolimus bzw. 0,9%iger NaCl-Lösung in den einzelnen Gruppen durchgeführt. Zu Beginn der Experimente wurden die Versuchstiere mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran wie beschrieben narkotisiert. Anschließend wurden die Tiere gewogen



(Waage ADE, Hamburg, Deutschland). Während der Operation wurde das Inhalationsnarkotikum über eine Nasenmaske mit einem Flow von einem Liter pro Minute appliziert. Die Isofluran-Dosis konnte je nach Bedarf über den Vaporisator (0,2-5Vol%) geregelt werden. Das Abdomen der Tiere wurde erneut rasiert (Electra GH 204; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland). Im Anschluss erfolgte die Fixation der Versuchstiere in Rückenlage auf einem Operationstisch, einer Metallplatte mit integriertem Heizelement (Effenberger; Pfaffing/Attel, Deutschland). Dies ermöglichte eine Aufrechterhaltung der Körperkerntemperatur der Versuchstiere von ca. 37°C. Zu Beginn der Operation erfolgte die Relaparotomie entlang der medianen Laparotomie naht. Die seitlichen Wundränder wurden mittels Wundhaken aufgespannt. Anschließend erfolgte die Mobilisation von Dünn- und Dickdarmschlingen aus dem Situs. Während des chirurgischen Eingriffs wurden diese auf eine angefeuchtete Mullkomresse auf der linken Körperseite der Ratte gebettet und mit 37°C warmer Kochsalzlösung regelmäßig befeuchtet.

Darauf wurde den Tieren 1ml Blut mit einer zuvor heparinisierten Spritze (Kanüle: Unolok 26x1/2, Spritze: 1ml BD Plastipak; Heidelberg, Deutschland) aus der Vena cava inferior entnommen. Anschließend erfolgte eine 3D-Sonographie des tumortragenden Leberlappens zur Tumorgroßenevaluation bei geöffnetem Situs. Für die chirurgische Präparation kam ein Operationsmikroskop (Typ 38400, Wild Heerburg, Schweiz) zum Einsatz. Als nächstes wurde die Arteria gastroduodenalis dargestellt, proximal mit einem Klemmchen verschlossen, mobilisiert und mit 6-0 Seide (Resorba; Nürnberg, Deutschland) in einem Abstand von ca. 3mm dreifach angeschlungen. Nach Ligatur des Gefäßes mit der distal vorgelegten Ligatur erfolgte eine Inzision desselbigen. Ein zuvor heparinisierte Katheter (PE-50, ID 0.28mm, Portex; Hythe, England) wurde in die A. gastroduodenalis retrograd bis zum Abgang der A. gastroduodenalis aus der A. hepatica communis eingeführt und mit dem vorgelegten proximalen Faden fixiert. An den Katheter war eine 1ml Spritze (BD Plastipak; Heidelberg, Deutschland) angeschlossen, in der sich die zu applizierende

Lösung befand. Je nach Gruppenzugehörigkeit, Behandlungs- oder Kontrollgruppe, wurde dann die Infusion mit Torisel® (0,3mg/kg KG in 1ml Lösung; Torisel® Pfizer; Berlin, Deutschland) oder analog 1ml isotone Kochsalzlösung nach Entfernung des Klemmchens appliziert (Abbildung 6). Nach erfolgter Injektion wurde der Katheter entfernt und die Arterie mittels des vorgelegten proximalen Seidenfadens verschlossen. Bei Bluttrockenheit wurde das ausgelagerte Intestinum wieder in den Situs verbracht und die Wunde mittels einschichtig fortlaufender Naht verschlossen (Prolene 3-0, Ethicon/Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Abschließend wurde den Versuchstieren 5mg/kg Körpergewicht Carprofen (Rimadyl, Pfizer, Berlin, Deutschland) zur Analgesierung nach der Operation als subkutanes Depot injiziert.

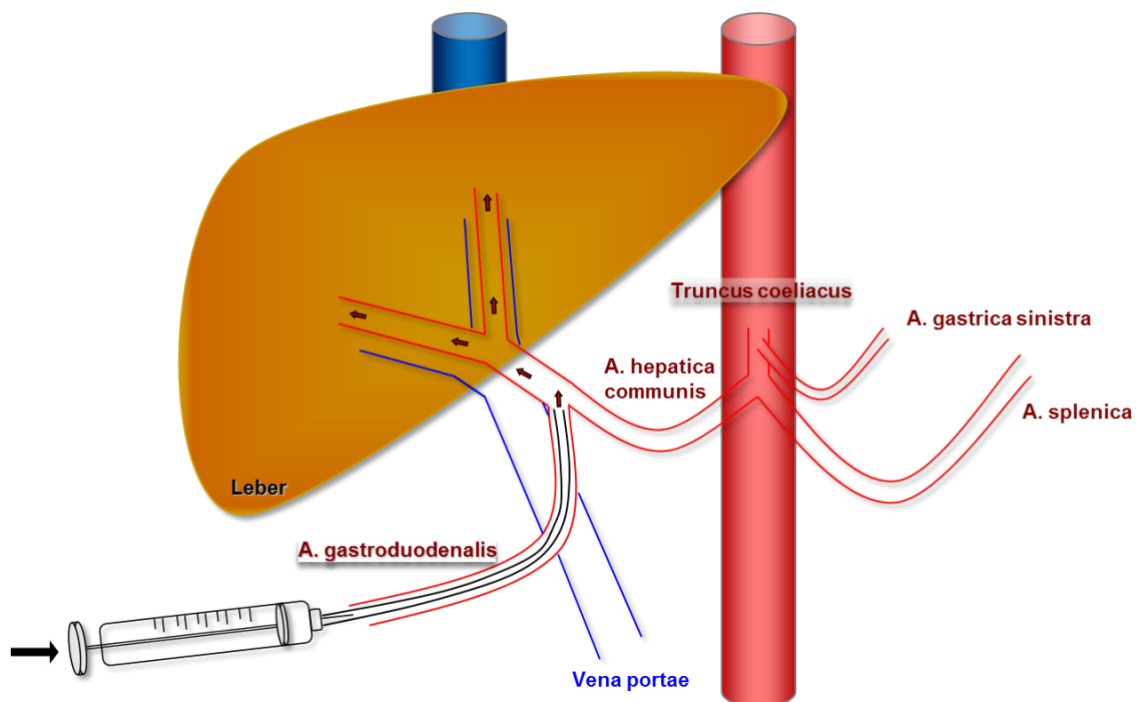


Abbildung 6: Schema der hepato-arteriellen Infusion. Mittels der Spritze (schwarzer Pfeil) erfolgte die Temsirolimus- bzw. Kochsalzapplikation. Die roten Pfeile zeigen den Fluss der Lösung über das Gefäßsystem in die Leber.

## 6.5. Kleintiersonographie

An Tag 10 und 13 wurde eine Ultraschalluntersuchung zur Größenbestimmung der induzierten Lebermetastase durchgeführt (high-resolution imaging system Vevo 770; Visual Sonics, Toronto, Canada). Hierzu wurde der Sektorschallkopf 704 (real-time microvisualization 704 Scanhead; Visual Sonics, Toronto, Canada) mit einer Center-Frequenz von 40MHz, einer lokalen Eindringtiefe von 6mm und einer lateralen Auflösung von 30µm benutzt. Nach vorangegangener Laparotomie und Mobilisation des linken Leberlappens wurden die Versuchstiere auf einem beheizbaren Untersuchungstisch der Ultraschallvorrichtung in Rückenlage fixiert und die inhalative Narkose über eine Nasenmaske mit Isofloran/Sauerstoff aufrechterhalten. Im zweiten Schritt wurde Ultraschallgel (Aquasonic 100, Parker, Fairfield, New Jersey, USA) zwischen Ultraschallkopf und dem Leberparenchym zur Vermeidung von Lufteinschlüssen und Entstehung von Artefakten appliziert. Um eine adäquate 3D-Bildrekonstruktion zu ermöglichen, wurde die Messung mittels eines linearen Motors gesteuert. Dieser produziert parallele 2D-Aufnahmen in vorher festgelegten Abständen von 50µm (Step Size). Die so entstandenen 2D-Aufnahmen des Gewebes werden dann vom Vevo 770 System über die Formel  $V_t$  (Tumorvolumen) =  $\frac{1}{2} \times (A+B) \times d$  verarbeitet, wobei A und B die Flächen der jeweils benachbarten trapezoiden Schnitte darstellen und d den Abstand dieser. Das Tumorvolumen wird über die Summe aller gefertigten 2D-Aufnahmen errechnet [62].

Das so entstandene 3D-Bild des Tumors wird, wie von Fenster et al. [36] beschrieben im „dynamic cube view“ Format (Abbildung 7) angezeigt und kann so ausgewertet werden. „Dynamic cube view“ beschreibt ein durch die 2D-Aufnahmen berechnetes Polyeder, welches durch die Grenzen des rekonstruierten Volumens dargestellt wird. Der Benutzer kann das gesamte Polyeder beliebig in jede Richtung drehen und in einem beliebigen Winkel zur ursprünglichen Abbildung bewegen, während die Ultraschalldaten kontinuierlich in Echtzeit abgebildet werden (Abbildung 7) [36].

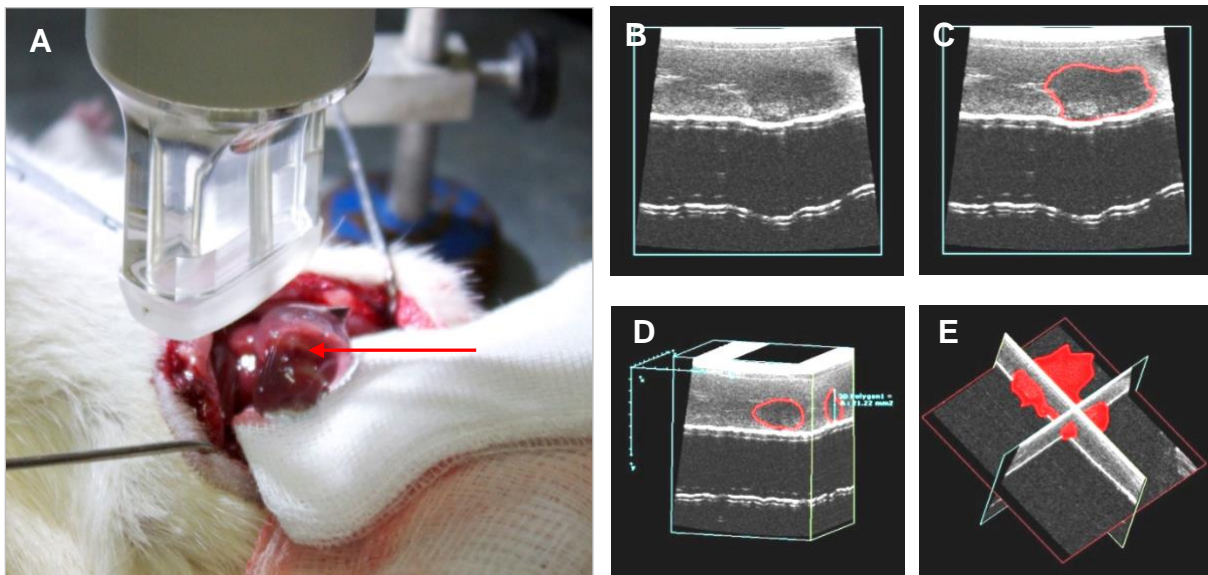


Abbildung 7 A-E: (A) Ultraschallmessung des Tumors im linken tumortragenden Leberlappen (roter Pfeil). (B) 2D-Ultraschallschnitt durch die Leber. (C) 2D-Ultraschallschnitt durch die Leber mit markiertem Tumoranteil (rote Umrandung). (D) 3D-Berechnung im „dynamic cube view“. (E) 3D-Rekonstruktion des Tumors.

## 6.6. Hämatologische Parameter und Enzymaktivität

Die intraoperativen Blutentnahmen an Tag 10 und Tag 13 der Experimente wurden stets vor chirurgischer Intervention, Medikamentengabe und Ultraschallmessung durchgeführt. Ein Teil des Blutes wurde nach Entnahme zur Bestimmung von Hämatokrit, Hämoglobingehalt, Kohlenstoffdioxidpartialdruck ( $\text{PaCO}_2$ ), Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ), pH-Wert sowie Basenüberschuss (base excess, BE) mittels dem Blut-Analysegerät Coulter ACT Diff (Coulter Electronics LTD, Buckinghamshire, England) ausgewertet. Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration wurden in gleicher Weise analysiert. Das verbleibende Blut diente der Analyse der Leberenzymaktivitäten. Die Proben wurden in einer Kühlzentrifuge (Universal 30RF; Hettich, Tuttlingen, Deutschland) für 10min bei  $4^\circ\text{C}$  und 3000U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das so entstandene Blutplasma abpipettiert und zur weiteren

Asservierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konserviert. Aus diesen Proben erfolgte die spektrophotometrische Bestimmung der Serumkonzentrationen der Leberenzyme Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Glutamatdehydrogenase (GLDH) und Laktatdehydrogenase (LDH).

## **6.7. Histomorphologie**

Das entnommene Gewebe von Leber und Tumor wurde in 4%igem phosphatgepuffertem Formalin für zwei bis drei Tage fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Für die histologische Untersuchung wurden aus den Gewebeproben  $5\mu\text{m}$  Schnitte gefertigt. Diese wurden dann mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und mit AS-D Chloracetatesterase (CAE) zur mikroskopischen Analyse gefärbt.

### **6.7.1. Hämatoxylin-Eosin**

Die HE-gefärbten Präparate wurden semi-quantitativ ausgewertet. Die Hepatozyten wurden in Bezug auf Grobscholligkeit des Zytoplasmas, Zellkerndeformation und Vakuolisierung in Grade von 0 bis 3 eingestuft und ausgewertet (Abbildung 8). Die Auswertung erfolgte nach Calabrese et al. [17] in jeweils 25 High Power Fields (HPF) pro Leberschnitt:

Grad 0 = nein (0% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)

Grad 1 = leicht (<30% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)

Grad 2 = mäßig (40%-70% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)

Grad 3 = schwer (>70% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)

Weitere Untersuchungsparameter hinsichtlich der Gefäßmorphologie waren Endothelablösung, Fibrinthromben und eine Wandständigkeit intraluminarer Erythrozyten (Abbildung 8).

Die Schnitte wurden ebenfalls in 25 HPF unterteilt. Die Ergebnisse wurden als Prozentwerte bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Gefäße angegeben.

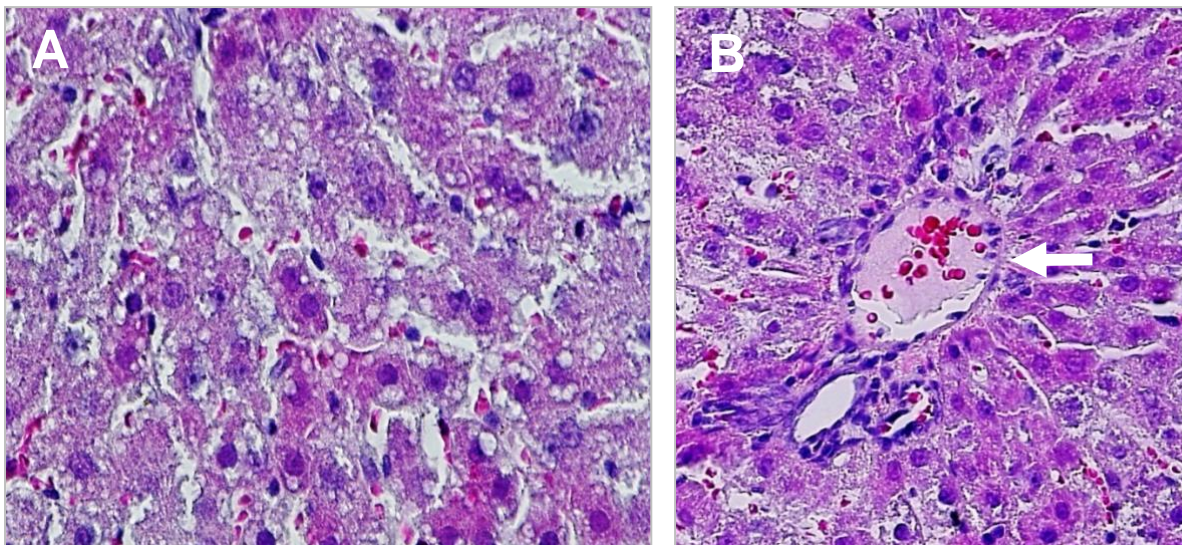


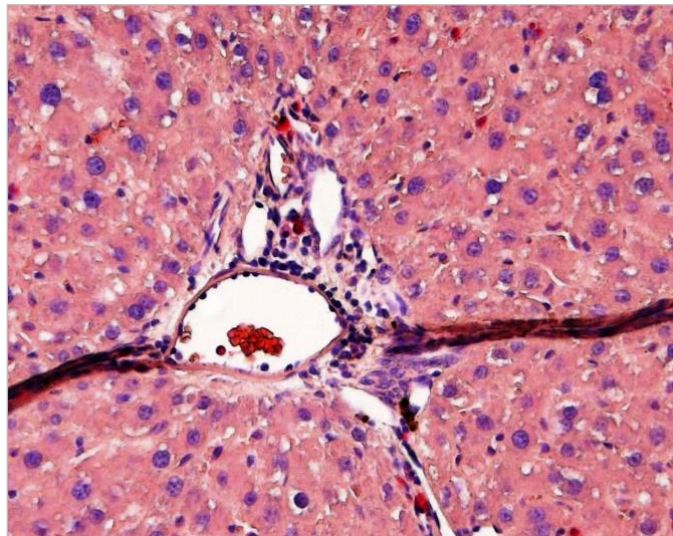
Abbildung 8 A und B: (A) HE-Färbung in 400x Vergrößerung. Dargestellt ist Lebergewebe eines Rapa Tieres. Es zeigt sich Vakuolisierung und Grobscholligkeit Grad 3. (B) HE-Färbung in 200x Vergrößerung eines Rapa Tieres. Es zeigt sich ein Gefäßthrombus (weißer Pfeil).

### 6.7.2. AS-D Chloracetatesterase

Für die quantitative Analyse der Leukozyteninfiltration wurden die Leberschnittpräparate mittels der AS-D Chloracetatesterase gefärbt (Abbildung 9).

Die Leukozyteninfiltration wurde in folgenden Leberarealen gemessen:

- intravasal
- perivaskulär
- parenchymal



*Abbildung 9: CAE-gefärbter Schnitt, 200x Vergrößerung. Leukozyten sind rot angefärbt. Der Schnitt zeigt ein Periportalfeld sowohl mit intravasalen als auch perivaskulären Leukozyten.*

## 6.8. Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie ist, antigene Determinanten, wie z.B. Proteine, sichtbar zu machen. Spezifische Antikörper, mono- oder polyklonal, binden an das jeweilige Antigen. Mittels Enzym oder einem fluoreszierenden Farbstoff werden diese unter dem Mikroskop sichtbar gemacht. Es wird zwischen direkten und indirekten immunhistochemischen Verfahren unterschieden. Das direkte Verfahren beschreibt die direkte Bindung eines spezifischen Antikörpers, gekoppelt mit einem Enzym oder Farbstoff an das Antigen. Bei dem indirekten Verfahren, welches in den vorliegenden

Experimenten angewandt wurde, bindet zunächst ein nicht-konjugierter Antikörper an das Antigen. In einem zweiten Schritt bindet ein konjugierter Antikörper an den Antigen-Antikörper-Komplex. Das Konjugat des Sekundärantikörpers verfärbt sich durch Zugabe eines weiteren Substrats nach einer Enzym-Substrat-Reaktion und macht so das spezifische Antigen unter dem Mikroskop sichtbar [72].

### **6.8.1. Apoptose**

Zur quantitativen Auswertung der Apoptoserate mittels des Apoptosemarkers Caspase-3 (cysteine-aspartic-proteinase) wurden aus dem in Paraffin eingebetteten Leber- und Tumorgewebe Schnitte von 5µm angefertigt. Diese wurden bei Raumtemperatur über Nacht mit PBS (1ml) und einem polyklonalen rabbit-anti-cleaved-caspase-3-Antikörper (20µl, Verdünnung 1:50, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) inkubiert. Der unkonjugierte Antikörper bindet so an das Antigen (Caspase-3). Der Sekundärantikörper war ein Peroxidase-konjugierter goat-anti-rabbit-IgG-Antikörper (100µl, Verdünnung 1:100, Dianova, Hamburg, Deutschland). Dieser lagert sich bei Inkubation für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur dem Antigen-Antikörper-Komplex an. Das Chromogen 3,3-Diaminobenzidin färbt das Endprodukt. 3,3-Diaminobenzidin wird durch die konjugierte Peroxidase des Sekundärantikörpers oxidiert und bildet ein unlösliches Präzipitat brauner Farbe, das im Licht (380nm bis 780nm Wellenlänge) detektiert werden kann. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt. Die Auswertung der Caspase-3-positiven Zellen erfolgte in 25 High Power Fields je Präparat. Es wurden die gefärbten Zellen pro Feld gezählt und als absolute Zahl/HPF angegeben (Abbildung 10).



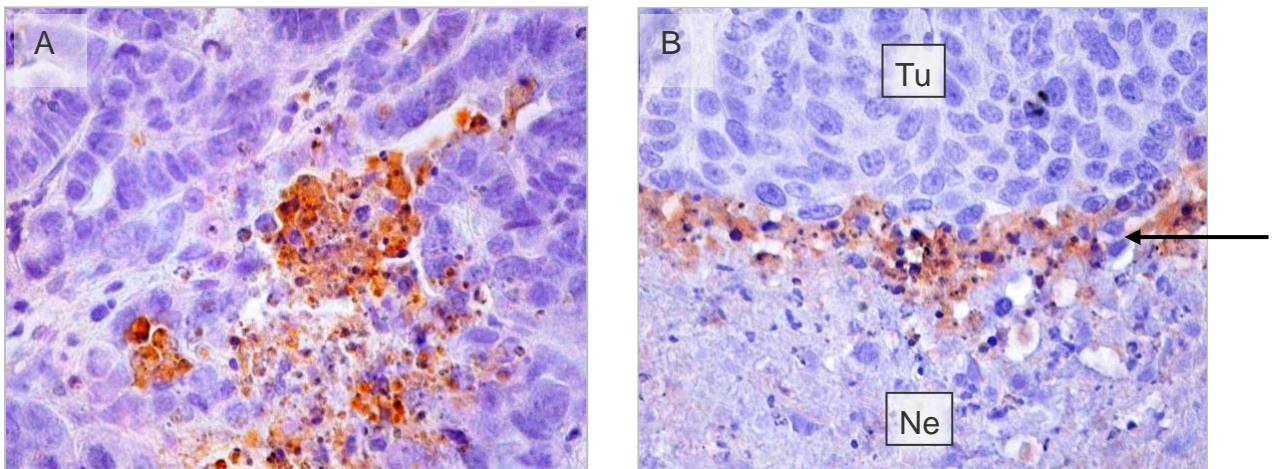
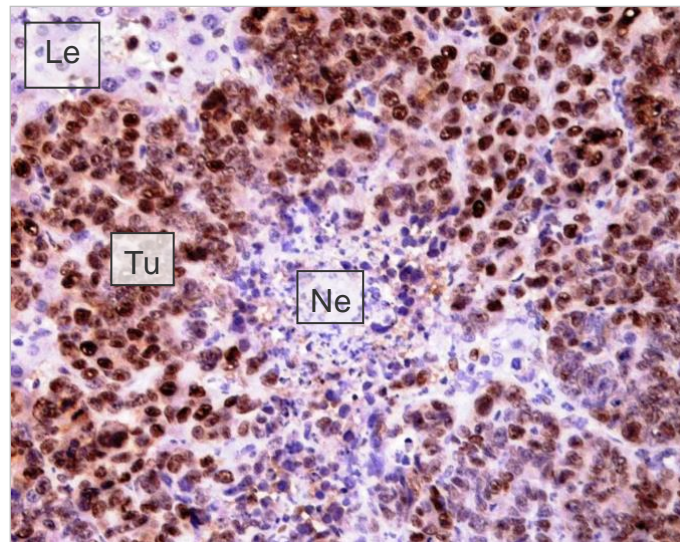


Abbildung 10 A und B: Präparate des Apoptosemarkers Caspase-3. Dargestellt ist bei A und B Tumorgewebe eines Tieres der Rapa-Gruppe in 200x Vergrößerung. Abbildung (A) Die braun gefärbten Zellen sind Apoptose-positiv. Abbildung (B) zeigt den Übergang von Tumorgewebe (Tu) in eine Nekrose (Ne) gesäumt von einem Rand Caspase-3-positiver Zellen (schwarzer Pfeil).

## 6.8.2. Proliferation

Ein Indikator für die Zellproliferation ist PCNA (Proliferation-Cell-Nuclear-Antigen). Zur Auswertung wurden 5µm Schnitte aus den Paraffin-Präparaten gefertigt. Hierfür werden die Schnitte für 18h bei 4°C mit einem monoklonalen mouse-anti-PCNA-Antikörper (20µl, Verdünnung 1:50, Dako, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Als Sekundärantikörper diente der Peroxidase-konjugierte goat-anti-mouse-IgG-Antikörper (1:1000, Dianova, Hamburg, Deutschland), der für 30min aufgebracht wurde. Als Chromogen diente 3,3-Diaminobenzidin. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegen gefärbt (Abbildung 11). Im Rahmen der quantitativen Analyse wurde folgender Score verwendet:

0 = <1%	positive Zellen pro High Power Field (HPF)
1 = 1%-10%	positive Zellen pro High Power Field (HPF)
2 = 10%-30%	positive Zellen pro High Power Field (HPF)
3 = 30%-50%	positive Zellen pro High Power Field (HPF)
4 = >50%	positive Zellen pro High Power Field (HPF)

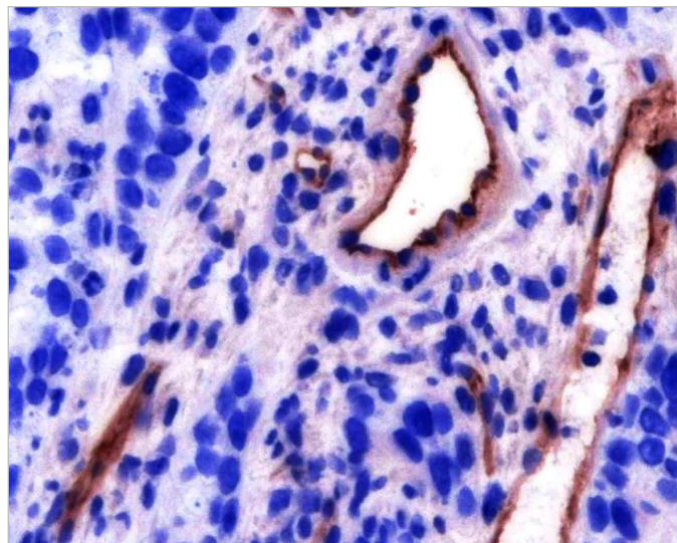


*Abbildung 11: Präparat des Proliferationsmarkers PCNA eines Tieres der Rapa-Gruppe in 200x Vergrößerung. PCNA-positive Zellen sind braun gefärbt. Es zeigt sich Tumorgewebe (Tu) mit einer zentralen Nekrose (Ne). Links oben befindet sich Lebergewebe (Le) neben dem Tumorgewebe (Tu).*

### 6.8.3. Vaskularisierung

Für die immunhistochemische Untersuchung der Angiogenese im Tumorgebiet wurde PECAM-1 (platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1), ein Marker für Endothelzellen, verwendet. Hierzu wurden 5µm Gefrierschnitte aus den Tumorpräparaten gefertigt und gefärbt. Der in diesem Fall verwendete

Primärantikörper war ein mouse-anti-rat-CD31-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:500 (Klon TLD-3 A12, Serotec, Puchheim, Deutschland). Dieser wurde über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper kam der Peroxidase-konjugierte goat-anti-mouse-HRP-Antikörper mit einer Verdünnung von 1:100 (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte 30min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Das Chromogen 3,3-Diaminobenzidin färbt das Endprodukt braun. Die Schnitte wurden mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt. Bei der Auswertung wurden die Gefäße anhand signalpositiver Zellen innerhalb des Tumorgewebes visualisiert und in je 25 High Power Fields pro Schnitt ausgezählt. (Angabe als absolute Zahl/HPF) (Abbildung 12).



*Abbildung 12: PECAM-1-gefärbtes Präparat in 200x Vergrößerung eines Tieres der PBL Sham-Gruppe. PECAM-1-positive Zellen sind braun gefärbt und markieren so die Vaskularisierung des Tumorgewebes.*

Alle histologischen und immunhistochemischen Auswertungen wurden an einem Lichtmikroskop (Olympus BX60, Olympus Optical Company Deutschland GmbH,

Hamburg, Deutschland) mit 400x Vergrößerung durchgeführt. Einzig die Untersuchung der HE-angefärbten Schnitte zur Gefäßbeurteilung bezüglich Fibrinthrombus, Endothelablösung sowie Erythrozytenwandständigkeit erfolgte in 200x Vergrößerung. Die an das Mikroskop angeschlossene Kamera (Zeiss Axio Cam, Zeiss, Jena, Deutschland) ermöglichte eine Fotodokumentation.

## **6.9. Experimentelles Protokoll**

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Der Versuchsantrag wurde von der Ethikkommission des Saarlandes bewilligt.

Die Dauer eines Experiments erstreckte sich insgesamt über 13 Tage. Die Versuchstiere wurden in sechs Versuchsgruppen randomisiert. Dies beinhaltete jeweils drei Sham (Sham, PBL Sham, Phx Sham) und drei Temsirolimus Gruppen (Rapa, PBL Rapa, Phx Rapa). Pro Gruppe wurden sechs Tiere untersucht (Abbildung 13).

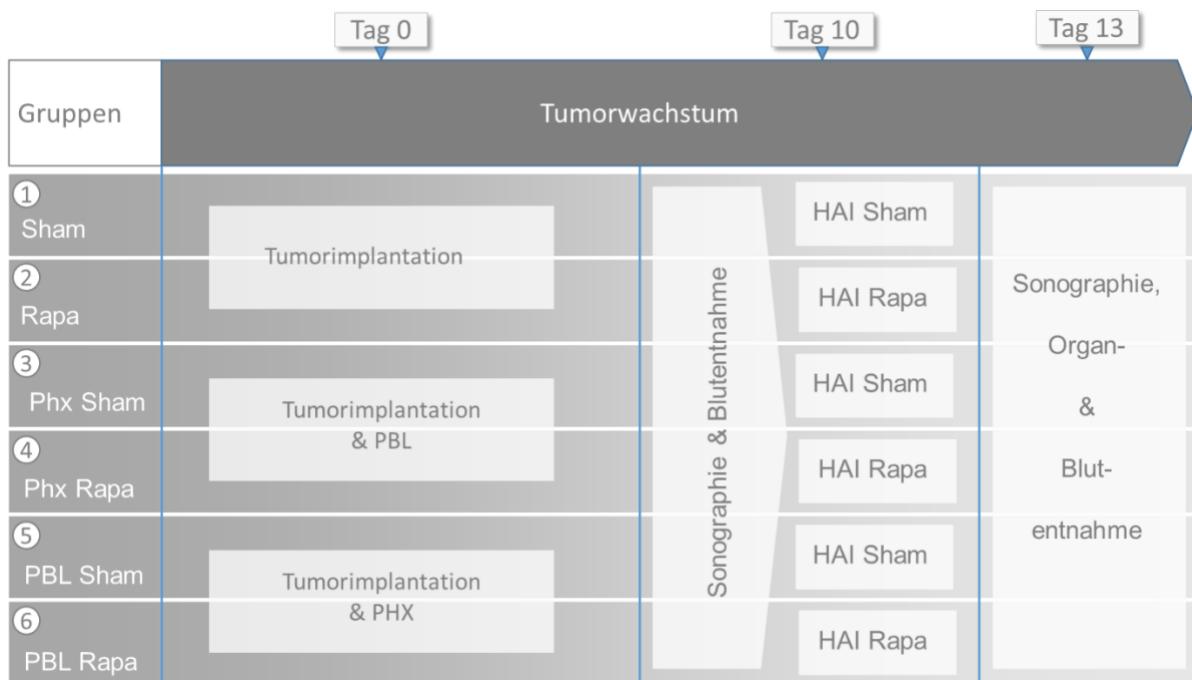


Abbildung 13: Schema der Einteilung der Versuchsgruppen und des Versuchsaufbaus. Dauer des Versuchs 13 Tage. Sham = 0,9% NaCl, Rapa = Temsirolimus, Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur; HAI = hepato-arterielle Infusion

An Tag 0 erfolgte in allen Gruppen die Implantation der CC531-Tumorzellen in den linken Leberlappen. In zwei Gruppen, Phx Rapa und Phx Sham, wurde zudem simultan eine 70%ige Resektion des Nicht-tumortragenden-Lebergewebes durchgeführt. In den Gruppen PBL Rapa und PBL Sham wurde nach Tumorzellimplantation die Pfortader des tumortragenden Leberlappens ligiert.

An Tag 10 erfolgte in allen Gruppen die hepato-arterielle Infusion. Je nach Versuchsgruppe wurde entweder Temsirolimus oder eine identische Menge isotoner Kochsalzlösung infundiert. Vor Durchführung der HAI wurde eine 3D-Ultraschall-Untersuchung zur Größenbestimmung der Tumore durchgeführt.

An Tag 13 wurde erneut eine 3D-Ultraschall-Untersuchung der Tumore vorgenommen. Im Anschluss erfolgte die Tötung der Versuchstiere mit 1,25-2,50mg/kg Körpergewicht

Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) intravenös. Anschließend wurde die Gewebeentnahme für die weiteren histologischen und immunhistochemischen Analysen vorgenommen.

An Tag 10 und 13 wurden zudem vor der hepato-arteriellen Infusion und der Ultraschall-Untersuchung venöse Blutproben aus der Vena cava entnommen. Zur Verlaufsbeurteilung wurde das Körpergewicht an allen drei Versuchstagen bestimmt.

### **6.9.1. Gewebeentnahme**

Am letzten Tag des Experiments wurden die Tiere ein weiteres Mal nach beschriebener Methode narkotisiert. Gemäß Tag 10 erfolgte wiederum ein Wiegen und eine weitere 1ml Blutentnahme aus der Vena cava inferior. Der Lebertumor wurde zur Wachstumsverlaufskontrolle per 3D-Sonographie vermessen.

Um die anschließende Organentnahme zu ermöglichen, wurde den Versuchstieren Pentobarbital-Natrium (Narcoren®; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) 1,25-2,50mg/kg Körpergewicht intravenös in die Vena cava inferior appliziert, was einen Herz-Kreislaufstillstand zur Folge hatte. Für die histologische Auswertung wurden zum einen Gewebeproben des Tumors und zum anderen Gewebeproben des Nicht-tumortragenden-Leberlappens entnommen und asserviert. Bei der Öffnung des Abdomens an Tag 10 sowie bei Entnahme der Organe an Tag 13 wurde überdies auf eine eventuelle extra- oder intrahepatische Tumoraussaat geachtet.

## **6.10. Datenerfassung und Statistik**

Die ausgewerteten Parameter wurden zunächst handschriftlich festgehalten und anschließend in Excel-Tabellen übertragen und zusammengefasst (Microsoft®Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, Washington State, USA).

Daraufhin erfolgte die Auswertung der erhobenen Datensätze. Es wurden die Mittelwerte (MW), sowie die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM, Standard error of the mean) errechnet. Nach Feststellung von Varianzgleichheit und Normalverteilung der Werte wurde eine Varianzanalyse mittels ANOVA (one-way analysis of variance) durchgeführt. Daraufhin erfolgte ein post-hoc Test, welcher die Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers gemäß Bonferroni enthielt. Als signifikant wurde ein Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  festgelegt. Für die statistischen Erhebungen und graphische Darstellung dienten die Programme SigmaStat 3.0 und SigmaPlot (Jandel Corporation, San Jose, CA, USA).

## 7. ERGEBNISSE

Bei allen Versuchstieren konnte mittels der subkapsulären Tumorzellinjektion ein Tumor im linken Leberlappen induziert werden. Die Inhalationsnarkose wurde gut vertragen und alle Tiere erwachten nach einer kurzen Aufwachphase problemlos. Während des Tumorwachstums von 10 Tagen wurden keine relevanten Änderungen des Trink-, Fress- und Putzverhaltens der Tiere bemerkt. Ebenso wenig fielen keine periokulären Rötungen oder Verfärbungen des Fells der Tiere auf. Sowohl nach Tag 0 wie auch nach Tag 10 verlief die Wundheilung der medianen Laparotomie der Sham-Gruppen problemlos. Die Tiere der Temsirolimus-Gruppen zeigten ebenfalls keinerlei Zeichen einer Wundinfektion. Jedoch schien die Laparotomienaht weniger stabil, was sich in einer erleichterten Relaparotomie an Tag 13 bemerkbar machte. Bei keinem der Tiere fand sich ein Hinweis auf ein extrahepatisches Tumorwachstum.

### 7.1. Tumolvolumen

Bei allen mit Temsirolimus behandelten Gruppen wurde eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens im Vergleich zu den korrespondierenden Sham-Gruppen gemessen. Von Tag 10 bis Tag 13 zeigte sich in der Kontrollgruppe Sham eine Größenzunahme des Tumors um fast 40%. Im Gegensatz dazu war das Tumorwachstum in der Rapa-Gruppe (+0,5±7,7%) komplett inhibiert (Abbildung 14). Das stärkste Tumorwachstum zeigte sich in der Phx Sham-Gruppe (+63,2±9,9%). Mittels der einmaligen hepato-arteriellen Infusion von Temsirolimus konnte in der Phx Rapa-Gruppe nicht nur eine Hemmung des Tumorwachstums, sondern sogar eine signifikante Reduktion des Volumens erreicht werden (Phx Rapa: -8,3±13,1%) (Abbildung 14). Auch in der PBL Sham-Gruppe kam es zu einer 50%igen Zunahme



des Tumorzvolumens nach 13 Tagen. In der Behandlungsgruppe wurde das Tumorzvolumen vollständig inhibiert (PBL Rapa:  $-1,1 \pm 4,7\%$ ) (Abbildung 14).

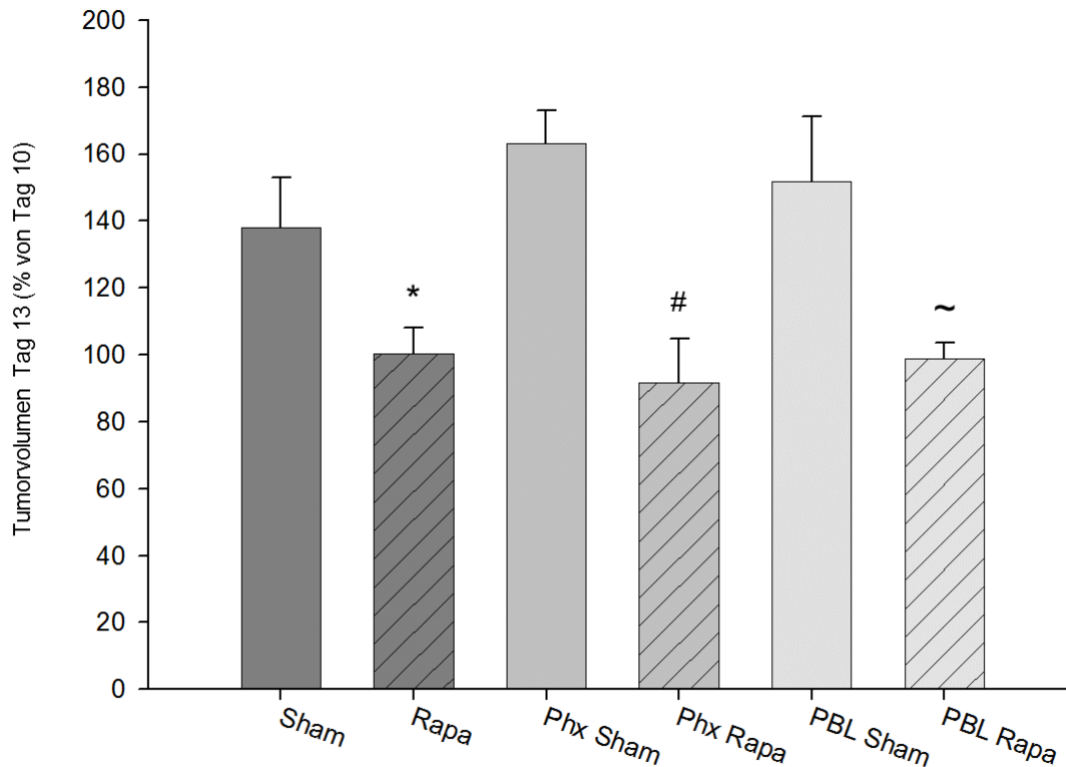


Abbildung 14: Tumorzvolumen an Tag 13 (in % des Ausgangswertes an Tag 10), nach hepatoarterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0.05$  vs. Sham, # $p < 0.05$  vs. Phx Sham, ~ $p < 0.05$  vs. PBL Sham.

## 7.2. Körpergewicht

Im Verlauf des Versuchs war das Körpergewicht der Versuchstiere nur leichten Schwankungen unterlegen und unterschritt bei allen Tieren zu keiner Zeit den Ausgangswert um mehr als 10%. Am Ende der Versuche war das durchschnittliche

Gewicht der Rapa-Gruppe signifikant niedriger als das der korrespondierenden Sham-Gruppe ( $92,5 \pm 0,4\%$  vs.  $97,7 \pm 0,4\%$ ). Anders in der Leberresektionsgruppe (Phx), hier war das Gewicht der Sham-Gruppe ( $90,2 \pm 0,8\%$ ) signifikant niedriger als das der Temsirolimus-Gruppe ( $92,4 \pm 0,6\%$ ). In den PBL-Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied des Körpergewichts zwischen behandelten und unbehandelten Tieren (Abbildung 15).

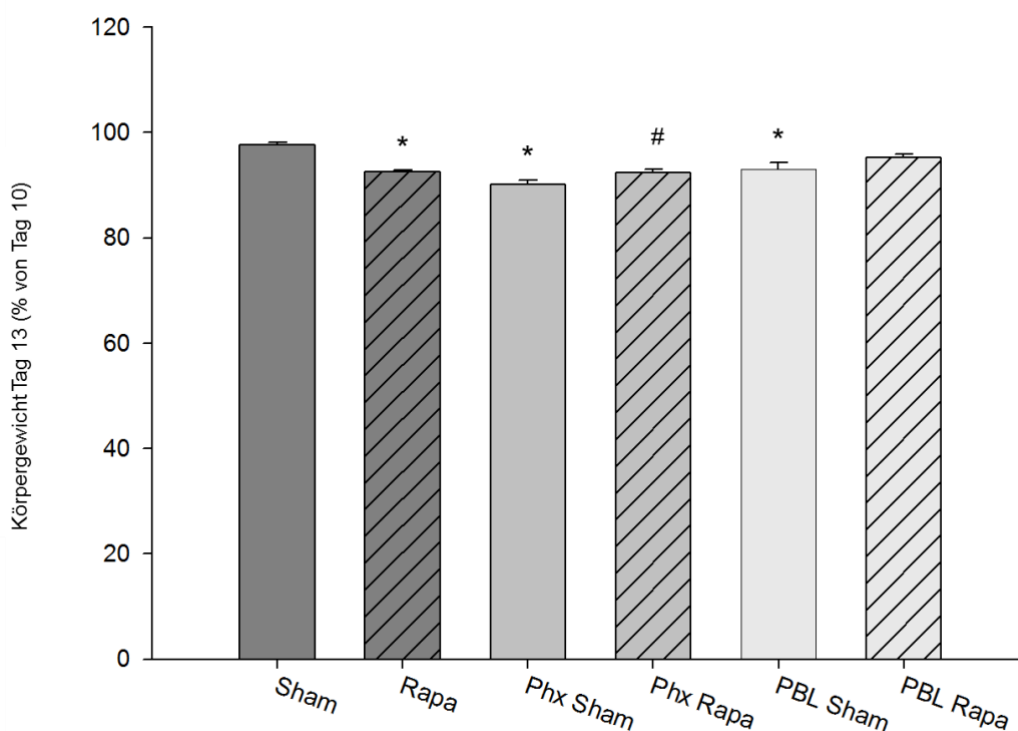


Abbildung 15: Körpergewicht an Tag 13 (in % des Ausgangswertes an Tag 10), nach hepatoarterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0.05$  vs. Sham; # $p < 0.05$  vs. Phx Sham.

### 7.3. Hämatologische Parameter und Enzymaktivität

Aus den an Tag 10 und 13 entnommenen Blutproben wurden die Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration sowie der Hämoglobingehalt bestimmt.

An Tag 10 war die Leukozytenkonzentration im Blut in der Rapa-Gruppe signifikant niedriger als in der korrespondierenden Sham-Gruppe. Des Weiteren zeigte sich, dass die Phx Sham-Gruppe niedrigere Leukozytenkonzentrationen aufwies als die Sham-Gruppe (Tabelle 1).

Die Leukozytenkonzentration an Tag 13 war in der Rapa-Gruppe signifikant niedriger im Vergleich zur Sham-Gruppe (Tabelle 1).

Gruppe	Tag 10	Tag 13
Sham	15,6 ± 1,9	21,3 ± 1,4
Rapa	8,9 ± 2,2*	13,4 ± 1,1*
Phx Sham	7,1 ± 0,7*	14,5 ± 1,3
Phx Rapa	9,7 ± 0,6	14,6 ± 2,8
PBL Sham	14,1 ± 1,8	13,8 ± 2,4
PBL Rapa	13,2 ± 2,3	11,9 ± 1,1

*Tabelle 1: Leukozytenkonzentration ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) an Tag 10 und 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0.05$  vs. Sham.*

Die Analyse der Thrombozytenkonzentrationen zeigte an Tag 10 bei Phx Sham mit  $1149,1 \pm 43,7 \times 10^3/\mu\text{l}$  den höchsten Wert. Verglichen hierzu fanden sich bei den Sham-

und PBL Sham-Tieren signifikant niedrigere Werte. Die geringste Thrombozytenkonzentration zeigte die PBL Rapa-Gruppe. Sie war signifikant niedriger als die der Rapa-Gruppe.

Die Auswertung an Tag 13 zeigte eine signifikant geringere Thrombozytenkonzentration der Phx Rapa-Gruppe verglichen mit der korrespondierenden Phx Sham-Gruppe (Tabelle 2).

<b>Gruppe</b>	<b>Tag 10</b>	<b>Tag 13</b>
<b>Sham</b>	<b>787,3 ± 135,8</b>	<b>742,0 ± 137,4</b>
<b>Rapa</b>	<b>959,3 ± 31,2</b>	<b>722,9 ± 73,3</b>
<b>Phx Sham</b>	<b>1149,1 ± 43,7*</b>	<b>1041,4 ± 26,5</b>
<b>Phx Rapa</b>	<b>970,7 ± 81,8</b>	<b>741,3 ± 66,4<sup>#</sup></b>
<b>PBL Sham</b>	<b>669,4 ± 100,8</b>	<b>770,4 ± 117,3</b>
<b>PBL Rapa</b>	<b>497,2 ± 65,9<sup>§</sup></b>	<b>454,8 ± 64,0</b>

*Tabelle 2: Thrombozytenkonzentration ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) an Tag 10 und 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0.05$  vs. Sham, <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. Phx Sham, <sup>§</sup> $p < 0.05$  vs. Rapa.*

Die Analyse des Hämoglobingehalts zeigte kaum signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sowie zwischen Tag 10 und 13. Den höchst gemessenen Hämoglobingehalt wies an Tag 13 die PBL Rapa-Gruppe mit  $16,35 \pm 1,12$  g/dl auf. Die PBL Sham-Gruppe war hierzu mit  $10,3 \pm 0,9$  g/dl signifikant niedriger (Tabelle 3).

<b>Gruppe</b>	<b>Tag 10</b>	<b>Tag 13</b>
<b>Sham</b>	<b>15,1 ± 0,5</b>	<b>11,6 ± 0,7</b>
<b>Rapa</b>	<b>14,8 ± 0,2</b>	<b>13,3 ± 1,2</b>
<b>Phx Sham</b>	<b>12,8 ± 0,1</b>	<b>10,5 ± 0,5</b>
<b>Phx Rapa</b>	<b>13,1 ± 0,5</b>	<b>11,7 ± 0,5</b>
<b>PBL Sham</b>	<b>17,4 ± 1,5</b>	<b>10,3 ± 0,9</b>
<b>PBL Rapa</b>	<b>18,7 ± 1,3</b>	<b>16,4 ± 1,1<sup>~</sup></b>

*Tabelle 3: Hämoglobingehalt (g/dl) an Tag 10 und 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes, <sup>~</sup>p<0.05 vs. PBL Sham.*

Aus dem Serum wurden die Leberenzyme Glutamatdehydrogenase (GLDH), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und die Lactatdehydrogenase (LDH) bestimmt. Der Vergleich der Werte an Tag 10 nach der Tumorimplantation ergab keinerlei signifikante Unterschiede bei der Analyse der Versuchsgruppen (Tabelle 4).

<b>Gruppe</b>	<b>GLDH</b>	<b>GOT</b>	<b>GPT</b>	<b>LDH</b>
<b>Sham</b>	<b>27,8 ± 7,0</b>	<b>202,3 ± 47,0</b>	<b>90,0 ± 11,3</b>	<b>2623,3 ± 795,4</b>
<b>Rapa</b>	<b>24,8 ± 2,9</b>	<b>205,5 ± 19,5</b>	<b>49,5 ± 4,5</b>	<b>3024,0 ± 345,0</b>
<b>Phx Sham</b>	<b>20,9 ± 6,0</b>	<b>191,4 ± 43,1</b>	<b>61,2 ± 10,0</b>	<b>2517,0 ± 659,5</b>
<b>Phx Rapa</b>	<b>26,8 ± 6,0</b>	<b>229,3 ± 23,4</b>	<b>84,9 ± 6,9</b>	<b>2941,7 ± 427,2</b>
<b>PBL Sham</b>	<b>16,1 ± 2,6</b>	<b>155,5 ± 22,6</b>	<b>68,0 ± 7,1</b>	<b>1821,5 ± 334,6</b>
<b>PBL Rapa</b>	<b>23,8 ± 5,0</b>	<b>196,5 ± 34,3</b>	<b>83,5 ± 8,0</b>	<b>2589,5 ± 642,9</b>

*Tabelle 4: Leberenzyme (GLDH = Glutamatdehydrogenase, GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, LDH = Lactatdehydrogenase (U/l) an Tag 10 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur.*

*Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes.*

An Tag 13 konnten signifikante Unterschiede der Enzymkonzentrationen zwischen den Versuchsgruppen gemessen werden. Die Konzentration des Enzyms GLDH hatte in der Sham-Gruppe mit  $36,6 \pm 4,7$  U/l den höchsten Wert. Demgegenüber war die GLDH Konzentration der Phx Sham-Gruppe signifikant niedriger ( $17,7 \pm 1,7$  U/l). Die Phx Rapa-Gruppe ( $32,2 \pm 3,0$  U/l) zeigte einen signifikant höheren Wert im Vergleich zur Phx Sham-Gruppe ( $17,7 \pm 1,7$  U/l).

Die Messung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase zeigte ein ähnliches Ergebnis. Die GOT-Konzentration der Phx Rapa-Gruppe ( $311,6 \pm 32,8$  U/l) war signifikant höher als die der Phx Sham-Gruppe ( $194,0 \pm 18,9$  U/l).

Statistisch relevante Unterschiede ergaben sich auch in der Analyse der Glutamat-Pyruvat-Transaminase. Der GPT-Wert der Rapa-Gruppe ( $37,5 \pm 1,5$  U/l) war signifikant

niedriger als der der Sham-Gruppe ( $65,6 \pm 5,2$  U/l). Nach Leberteileresektion zeigte Phx Rapa ( $66,0 \pm 5,5$  U/l) signifikant höhere Mittelwerte als Phx Sham ( $34,0 \pm 1,8$  U/l). Den höchsten Wert aller Gruppen zeigte PBL Rapa ( $79,5 \pm 10,4$  U/l).

Insgesamt wird deutlich, dass an Tag 13 nach Leberteileresektion und Temsirolimus Applikation (Phx Rapa) drei der vier gemessenen Leberenzymparameter (GLDH, GOT, GPT) gegenüber denen der Kontrollgruppe Phx Sham signifikant erhöht waren (Tabelle 5).

Gruppe	GLDH	GOT	GPT	LDH
Sham	$36,6 \pm 4,7$	$233,1 \pm 30,8$	$65,6 \pm 5,2$	$3138,0 \pm 622,6$
Rapa	$18,2 \pm 3,5$	$178,5 \pm 7,5$	$37,5 \pm 1,5^*$	$2223,0 \pm 294,0$
Phx Sham	$17,7 \pm 1,7^*$	$194,0 \pm 18,9$	$34,0 \pm 1,8$	$2860,5 \pm 264,2$
Phx Rapa	$32,2 \pm 3,0^\#$	$311,6 \pm 32,8^\#$	$66,0 \pm 5,5^\#$	$4245,0 \pm 561,7$
PBL Sham	$26,5 \pm 4,8$	$277,0 \pm 50,8$	$60,5 \pm 7,7$	$4069,0 \pm 938,2$
PBL Rapa	$23,3 \pm 4,0$	$257,0 \pm 20,9$	$79,5 \pm 10,4^\S$	$3063,5 \pm 512,6$

Tabelle 5: Leberenzyme (GLDH = Glutamatdehydrogenase, GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, LDH = Lactatdehydrogenase (U/l) an Tag 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteileresektion, PBL = Pfortaderastligatur.

Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0.05$  vs. Sham, # $p < 0.05$  vs. Phx Sham, ~ $p < 0.05$  vs. PBL Sham, § $p < 0.05$  vs. Rapa.

## 7.4. Histomorphologie

### 7.4.1. Hämatoxylin-Eosin

Die Auswertung der hepatozellulären Grobscholligkeit zeigte in allen Temsirolimus-behandelten Gruppen signifikant höhere Werte im Vergleich zur jeweils korrespondierenden Sham-Gruppe.

Die höchsten Werte wurden bei Phx Rapa ( $2,5 \pm 0,2$ ) und bei PBL Rapa ( $2,8 \pm 0,1$ ) bestimmt, welche sich untereinander aber nicht signifikant unterschieden. Die Gruppen PBL Rapa und Phx Rapa wiesen eine signifikant höhere hepatozelluläre Grobscholligkeit gegenüber der Rapa-Gruppe ( $2,0 \pm 0,1$ ) auf. Der Vergleich der Sham-Gruppen untereinander zeigte eine signifikant höhere hepatozelluläre Grobscholligkeit bei PBL Sham ( $1,8 \pm 0,3$ ) im Vergleich zu Sham ( $1,0 \pm 0,2$ ) (Tabelle 6).

Die Beurteilung der hepatozellulären Vakuolisierung zeigte hingegen nur geringfügige Unterschiede. Sowohl Tiere der Rapa ( $1,7 \pm 0,2$ ) als auch Phx Rapa ( $1,5 \pm 0,2$ ) wiesen eine signifikant höhere Vakuolisierung im Vergleich zu den korrespondierenden Sham-Gruppen auf. Der Vergleich der PBL-Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede. Auch die Werte der einzelnen Gruppen untereinander unterschieden sich nicht signifikant.



<b>Gruppe</b>	<b>Grobscholligkeit</b>	<b>Vakuolisierung</b>
<b>Sham</b>	<b>1,0 ± 0,2</b>	<b>0,9 ± 0,2</b>
<b>Rapa</b>	<b>2,0 ± 0,1*</b>	<b>1,7 ± 0,2*</b>
<b>Phx Sham</b>	<b>1,4 ± 0,1</b>	<b>1,0 ± 0,1</b>
<b>Phx Rapa</b>	<b>2,5 ± 0,2<sup>#§</sup></b>	<b>1,5 ± 0,2<sup>#</sup></b>
<b>PBL Sham</b>	<b>1,8 ± 0,3*</b>	<b>1,4 ± 0,1</b>
<b>PBL Rapa</b>	<b>2,8 ± 0,1<sup>~§</sup></b>	<b>1,2 ± 0,1</b>

*Tabelle 6: Hepatozelluläre Parenchymschädigung: Grobscholligkeit und Vakuolisierung, (ausgewertet nach dem Score 0-3: 0 = keine 1 = leicht 2 = mäßig 3 = stark) an Tag 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteileresektion, PBL = Pfortaderastligatur.*

*Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes, \*p<0.05 vs. Sham, #p<0.05 vs. Phx Sham, ~p<0.05 vs. PBL Sham, §p<0.05 vs. Rapa.*

Die Anzahl der Endothelläsionen in den portalen Venolen unterschied sich nicht signifikant von denen in den zentralen Venolen.

Es fanden sich signifikant mehr Fibrinthromben in den portalen und zentralen Venolen in der Rapa-Gruppe als in der Sham-Gruppe. Des Weiteren zeigten sich signifikant mehr wandständige Erythrozyten in der Phx Rapa-Gruppe im Vergleich zu der korrespondierenden Phx Sham-Gruppe. Die übrigen Analysen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 7).

<b>Gruppe</b>	<b>Endothelläsion</b>	<b>Fibrinthrombus</b>	<b>Wandständige Erythrozyten</b>
<b>Sham</b>	<b>0,6 ± 0,6</b>	<b>4,8 ± 1,8</b>	<b>12,0 ± 2,0</b>
<b>Rapa</b>	<b>4,0 ± 1,8</b>	<b>43,3 ± 0,3*</b>	<b>12,7 ± 5,4</b>
<b>Phx Sham</b>	<b>2,7 ± 2,0</b>	<b>20,0 ± 3,4</b>	<b>2,0 ± 2,0</b>
<b>Phx Rapa</b>	<b>0,6 ± 0,2</b>	<b>28,6 ± 6,0</b>	<b>8,6 ± 2,7<sup>#</sup></b>
<b>PBL Sham</b>	<b>1,3 ± 0,1</b>	<b>21,3 ± 3,0</b>	<b>6,7 ± 1,3</b>
<b>PBL Rapa</b>	<b>4,0 ± 1,5</b>	<b>22,7 ± 4,6</b>	<b>16,0 ± 8,2</b>

*Tabelle 7: Gefäßschädigung (%). Es wurden Endothelläsionen, Fibrinthromben und wandständige Erythrozyten beurteilt. Tag 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur.*

*Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes, \*p<0.05 vs. Sham, <sup>#</sup>p<0.05 vs. Phx Sham.*

## **7.4.2. AS-D Chloracetatesterase**

Die Analyse der intravasalen Leukozyteninfiltration ergab signifikant mehr Leukozyten der Rapa-Gruppe im Vergleich zu der Sham-Gruppe.

Die perivaskuläre Leukozyteninfiltration war bei Phx Rapa Tieren gegenüber Phx Sham Tieren signifikant vermindert. Parenchymal zeigte sich eine vermehrte Leukozyteninfiltration bei PBL Rapa Tieren im Vergleich zu den PBL Sham-Tieren (Tabelle 8).

Gruppe	Intravasal	Perivaskulär	Parenchymal
Sham	0,1 ± 0,1	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,4
Rapa	0,7 ± 0,1*	1,1 ± 0,3	0,7 ± 0,2
Phx Sham	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Phx Rapa	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2 <sup>#</sup>	0,8 ± 0,1
PBL Sham	0,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1
PBL Rapa	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,1 <sup>~</sup>

Tabelle 8: Leukozyteninfiltration in das Lebergewebe an Tag 13. Es wurden die positiven Zellen intravasal, perivaskulär und parenchymal gezählt (angegeben als Absolutwerte pro HPF). Tag 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur.

Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0.05$  vs. Sham, <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. Phx Sham, <sup>~</sup> $p < 0.05$  vs. PBL Sham.

## 7.5. Immunohistochemie

### 7.5.1. Apoptose

Im Lebergewebe wiesen alle Temsirolimus-behandelten Tiere eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zu ihren jeweilig korrespondierenden Sham-Gruppen auf. Rapa ( $4,4 \pm 0,9$ ) sowie Phx Rapa ( $3,6 \pm 0,9$ ) zeigten signifikant mehr Apoptosen als ihre korrespondierende Sham-Gruppen (Sham:  $0,01 \pm 0,01$ , Phx Sham:  $1,5 \pm 0,3$ ). Verglichen mit Sham zeigten, mit Ausnahme von Phx Sham, alle anderen Gruppen eine signifikant höhere Apoptoserate (Abbildung 16).

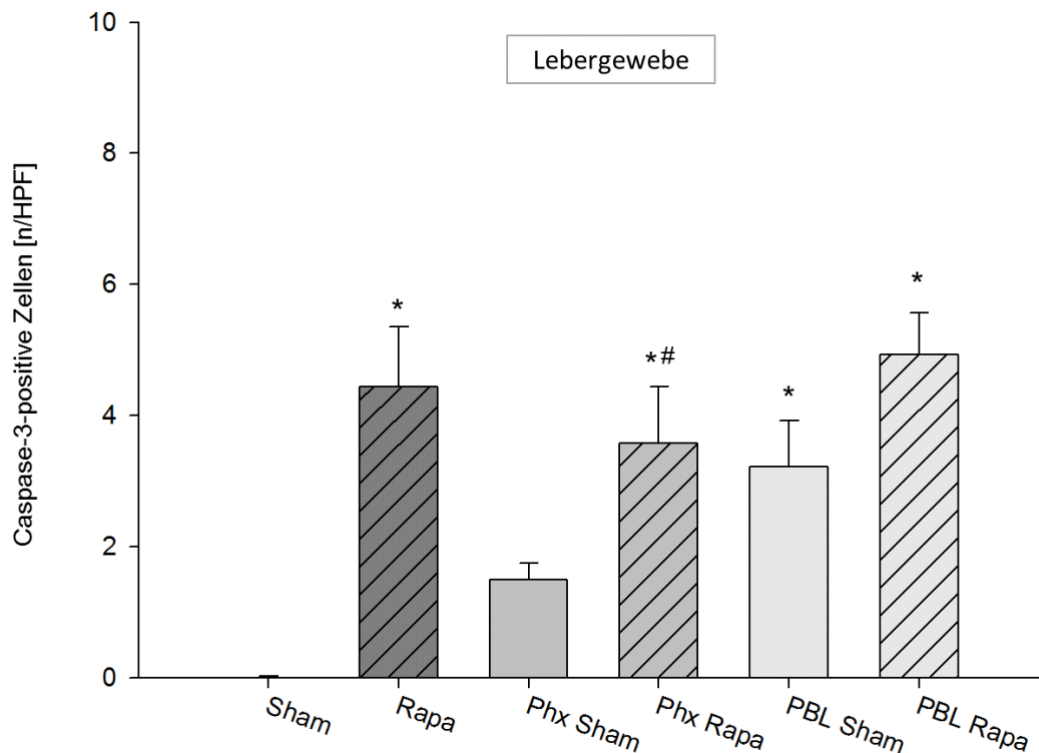


Abbildung 16: Immunhistochemische Analyse Caspase-3-positiver Zellen im Lebergewebe, (Caspase-3-positiv Zellen (Anzahl/pro HPF) an Tag 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0.05$  vs. Sham, # $p < 0.05$  vs. Phx Sham.

Der Vergleich der Caspase-3-positiven Zellen im Tumor ergab folgende Unterschiede: Rapa ( $5,9 \pm 0,6$ ) zeigte eine signifikant höhere Apoptoserate als die korrespondierende Sham-Gruppe ( $1,8 \pm 0,4$ ), ebenso PBL Rapa ( $7,2 \pm 1,6$ ) im Vergleich zur PBL Sham-Gruppe ( $2,5 \pm 0,7$ ). Die Phx Rapa-Gruppe ( $5,2 \pm 0,6$ ) zeigte, vergleichbar der hepatozellulären Apoptose, im Vergleich zu den Phx Sham Tieren ( $3,8 \pm 0,4$ ) keine signifikant höhere Apoptoserate. Die höchste Apoptoserate zeigte PBL Rapa nach hepato-arterieller Infusion mit Temsirolimus und Pfortaderastligatur, die niedrigste wurde für Sham gezählt (Abbildung 17).

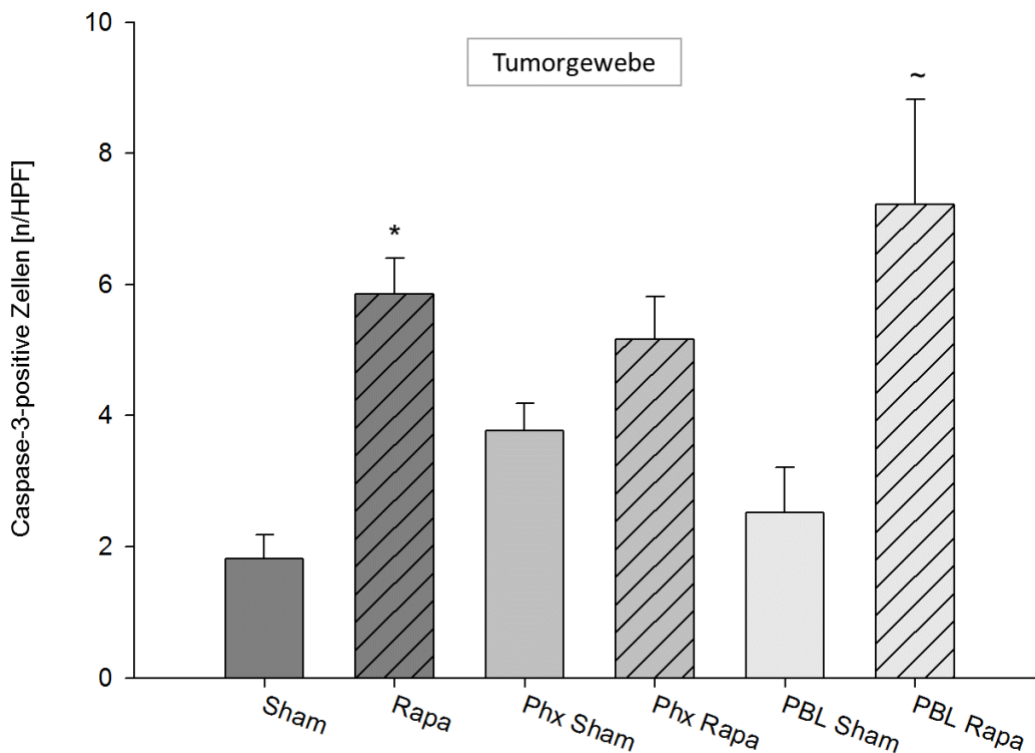


Abbildung 17: Immunhistochemische Analyse Caspase-3-positiver Zellen im Tumorgewebe, (Caspase-3-positiv Zellen (Anzahl/pro HPF) an Tag 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur.

Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0.05$  vs. Sham, ~ $p < 0.05$  vs. PBL Sham.

## 7.5.2. Proliferation

Insgesamt wies das Tumorgewebe eine höhere Proliferationsrate als das Lebergewebe auf.

Es zeigte sich eine signifikant höhere Proliferationsrate nach Rapa ( $0,4 \pm 0,0$ ) im Vergleich zu Sham ( $0,2 \pm 0,1$ ). Im Gegensatz zur PBL Sham-Gruppe ( $1,1 \pm 0,3$ ) hatte die

Phx Sham-Gruppe einen höheren Proliferationsindex als die Sham-Gruppe ( $0,2 \pm 0,1$ ) (Abbildung 18).

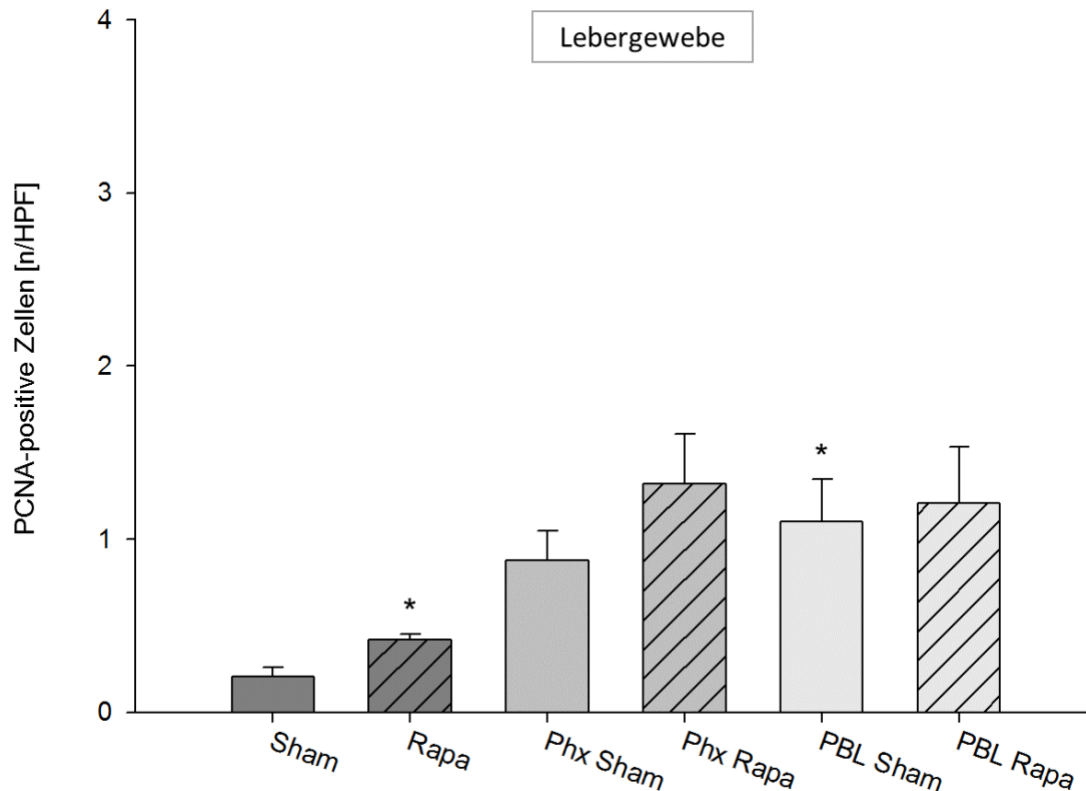


Abbildung 18: Immunhistochemische Analyse PCNA-positiver Zellen im Lebergewebe (Index 0: <1%, 1: 1-10%, 2: 10-30%, 3: 30-50%, 4: >50% / pro HPF) an Tag 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur.

Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0.05$  vs. Sham.

Die Auswertung des Tumorgewebes in den Temsirolimus-behandelten Gruppen zeigte insgesamt eine Proliferationshemmung. Nach Rapa ( $3,3 \pm 0,1$ ) war die Proliferationsrate signifikant niedriger als nach Sham ( $3,8 \pm 0,1$ ). Für die Pfortaderastligatur- und Resektionsgruppen ergab die Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungs- und Therapiegruppen (Abbildung 19).

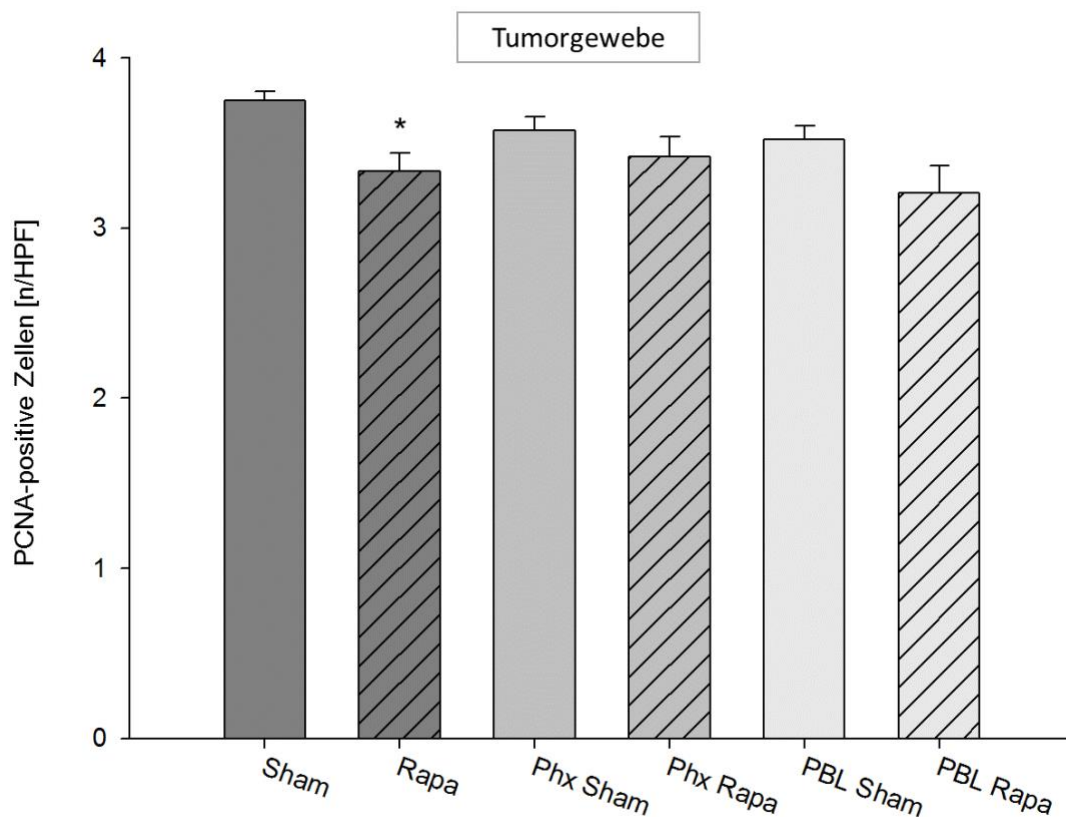


Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse PCNA-positiver Zellen im Tumorgewebe (Index 0: <1%, 1: 1-10%, 2: 10-30%, 3: 30-50%, 4: >50% / pro HPF) an Tag 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0.05$  vs. Sham.

### 7.5.3. Vaskularisierung

Die Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen untereinander zeigte in allen Temsirolimus-behandelten Gruppen eine signifikant geringere Vaskularisierung im Vergleich zu den korrespondierenden Sham-Gruppen. Den größten Wert hatte die Sham-Gruppe ( $10,1 \pm 1,0$ ). Niedrigere Werte zeigten sich sowohl nach Phx Sham ( $4,9 \pm 0,2$ ) als auch nach PBL Sham ( $4,9 \pm 0,2$ ). Die Behandlungsgruppen Phx Rapa

( $2,3 \pm 0,1$ ) und PBL Rapa ( $1,8 \pm 0,1$ ) zeigten signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen Phx Sham ( $4,9 \pm 0,2$ ) und PBL Sham ( $4,9 \pm 0,2$ ) (Abbildung 20).

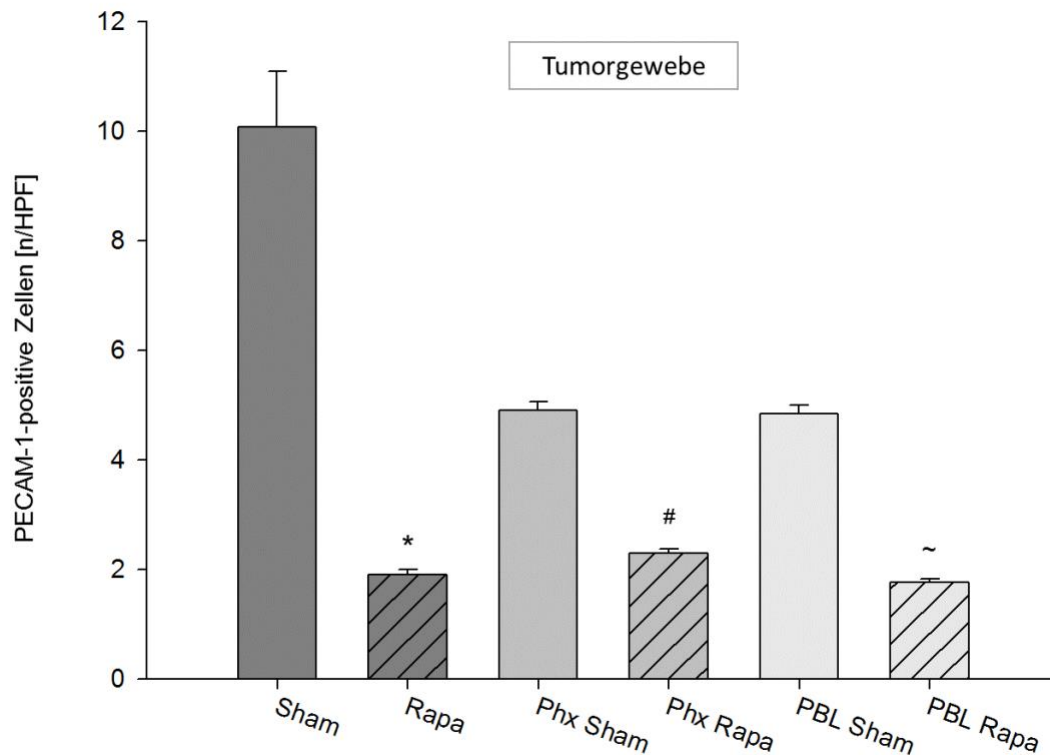


Abbildung 20: Immunhistochemische Analyse PECAM-1-positiver Zellen im Tumorgewebe (Anzahl der Gefäße / pro HPF) an Tag 13 nach hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, Phx Rapa, PBL Rapa) oder Kochsalzlösung (Sham, Phx Sham, PBL Sham) Phx = Leberteilresektion, PBL = Pfortaderastligatur.

Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, \* $p < 0,05$  vs. Sham, # $p < 0,05$  vs. Phx Sham, ~ $p < 0,05$  vs. PBL Sham.



## **8. DISKUSSION**

### **8.1. Diskussion von Material und Methoden**

#### **8.1.1. Tumorimplantation**

Die subkapsuläre Injektion von syngenem CC531 Tumorzellen in Lebern von WAG/Rij-Ratten ist ein anerkanntes Tumormodell zur Induktion von Lebermetastasen eines Kolonkarzinoms [25, 90, 92]. Die durch 1,2-Dimethylhydralazin chemisch induzierte Tumorzelllinie erzeugt ein mäßig differenziertes und schwach immunogenes Adenokarzinom in WAG/Rij-Ratten [66].

Bei dem angewandten Versuchsaufbau kommt es darauf an, reproduzierbare, solitäre und dadurch gut miteinander vergleichbare Tumore zu produzieren. Dies wird mittels der subkapsulären Tumorzellinjektion, welche von Kollmar et al. [58] 2004 im Mausmodell ausführlich beschrieben wurde, am ehesten gewährleistet. Nach Zellinjektion kommt es zu einer Zellimplantation, Neovaskularisierung und letztendlich Integration in das Lebergewebe. Diese Tumore eignen sich somit in besonderer Weise für eine quantitative Auswertung von Wachstum, Apoptose und Angiogenese. Die Methode bietet zudem die Möglichkeit den Ort der Metastasenentstehung mit einer standardisierten Tumorzellzahl festzulegen [58]. Dies ist für die vorliegende Studie essentiell. Durch die Induktion solitärer Metastasen im linken Leberlappen ist es möglich, eine Leberteilektomie des übrigen Lebergewebes bzw. eine Pfortaderastligatur des linken Leberlappens an Tag 0 durchzuführen, und dessen Auswirkungen zu untersuchen und zu vergleichen.

Der physiologische Weg der Entstehung von Lebermetastasen durch eine hämatogene Tumoraussaat ist in diesem Modell jedoch nicht gegeben. Es gibt eine Vielzahl von etablierten Methoden zur Induktion von Lebermetastasen in Tiermodellen wie de Jong und Mitarbeiter in einer Übersichtsarbeit 2009 zusammenfassten [26]. Dazu gehören die intraportale Injektion von Tumorzellen, die den physiologischen hämatogenen Metastasierungsweg und somit die frühe Phase der Tumorentstehung nachahmt [68]. Dieses Metastasenmodell führt zu einer Entstehung multipler Lebermetastasen, welches nur in geringem Maße interindividuell vergleichbar ist, und somit diesem Versuch nicht dienlich wäre. Eine weitere Möglichkeit stellt die Implantation von Tumorfragmenten in die Leber dar. Hier werden jedoch die Schritte der Tumorzellimplantation zusammen mit der ausgedehnten physiologischen Immunzellantwort von z.B. Kupfer-Stern-Zellen und Endothelzellen mit ihrer potentiellen prokanzerogenen Wirkung, im Gegensatz zum Injektionsmodell, nicht berücksichtigt, was gerade für die vorliegende Studie wichtig ist [58]. Um die Wirkung von Temsirolimus auf Neovaskularisierung, Proliferation und Apoptose zu untersuchen, muss die Tumorzellimplantation mit Neovaskularisierung gewährleistet sein. Zudem sollte untersucht werden, inwiefern die Leberteilresektion und Pfortaderastligatur den Wachstumsprozess und die Neovaskularisierung beeinflussen. Die Tumorzellfragmente werden aus einem bereits bestehenden Tumor mit Gefäßnetz entnommen, die frühe Wachstumsphase hat hier bereits stattgefunden. Die orthotope Tumorzellinjektion in das Kolon wie auch das Verbringen von Tumorzellen in die Milz als Primärtumoren spielen eher untergeordnete Rollen. Sie simulieren zwar am besten den natürlichen Weg der Tumoraussaat bei Metastasierung, sind aber wiederum für diesen Versuch nicht sinnvoll. Ein standardisiertes experimentelles Protokoll zur Tumorgrößenevaluation und Vergleichbarkeit der Tumoren untereinander, um eine etwaige Wirkung des verwendeten Medikaments festzustellen, ist nicht möglich. Zusammengefasst wird deutlich, dass die von Kollmar et al. [58] beschriebene

Methode ein guter Kompromiss von Gewährleistung der Metastasenmanifestation bzw. Wachstum und der Entstehung reproduzierbarer Tumoren ist.

### **8.1.2. Chirurgische Präparation**

Der hier verwendete Rattenstamm WAG/Rij erfüllt die Anforderungen dieses Modells im Besonderen. Neben der passenden Genetik für die Tumorzellimplantation sind sie außerdem stressresistent und weisen eine optimale Größe für den mikrochirurgischen Eingriff im Rahmen der hepato-arteriellen Infusion, der Leberteilresektion und der Pfortaderastligatur auf.

### **8.1.3. Pfortaderastliagtur**

Ein Teil der Fragestellung dieses Experiments war es, neben der generellen Wirksamkeit von Temsirolimus auf Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms, die Auswirkung auf die Metastasengröße nach Wachstumsinduktion durch Pfortaderastligatur und Leberteilresektion zu evaluieren. Ziel der vorliegenden Studie war es zudem das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Metastasen nach Pfortaderastligatur und Leberteilresektion zu vergleichen.

Wie bereits beschrieben wird der klinische Einsatz der Ligatur bzw. Embolisation kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigten ein erhöhtes Wachstum der kolorektalen Metastasen im ligierten Leberlappen nach Durchführung der Ligatur trotz gleichzeitiger Atrophie [11, 30, 55]. De Graaf et al. [24] kamen in einer umfassenden Übersichtsarbeit zum Schluss, dass das Tumorwachstum sowohl im ligierten als auch im nicht-ligierten Teil beschleunigt wird. Trotz dieser Ergebnisse stellt die Pfortaderastligatur weiterhin einen Schritt für Patienten in Richtung Kuration dar. Der wichtigste Mechanismus, der das Tumorwachstum nach Pfortaderastligatur beeinflusst ist neben der massiven

Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen die Steigerung des hepato-arteriellen Blutflusses. Dieser Mechanismus wird „hepatic arterial buffer response (HABR)“ genannt. Durch die Autoregulation der arteriellen Perfusion wird die Reduktion der Pfortaderdurchblutung kompensiert [63, 88, 89].

2007 untersuchten Kollmar et al. [56] dieses Phänomen in einem tierexperimentellen Versuch und fanden heraus, dass die PBL nur initial zu einer Verminderung der Mikrozirkulation mit Atrophie des ligierten Leberlappens führt. Gefolgt wird dies neben der HABR von einem mikrovaskulären Remodeling, parenchymaler Normoxygenierung und hepatozellulärer Proliferation. Anfänglich zeigte sich eine Reduktion des Blutflusses um ca. 50% an Tag 3. An Tag 14 des Experiments war der arterielle Fluss bereits um das Vierfache gesteigert und erreichte somit ca. 90% der anfänglichen Gesamtversorgung des Leberlappens, unter Berücksichtigung des Parenchymverlustes sogar eine 6,7fache Steigerung. Eine initiale hypoxische Schädigung mit Nekrotisierung wird gefolgt von einer vermehrten Apoptose am Tag 7. Zusätzlich kam es am Tag 14 zu einer 10fachen Erhöhung der Proliferationsrate des Leberparenchyms. Die Gewichtszunahme des ligierten Lappens korrelierte mit der Proliferationsrate [56]. Dies liefert eine mögliche Erklärung für das Wachstum von Metastasen des ligierten Leberlappens nach Pfortaderastligatur. In einem Folgeversuch von 2010 untersuchen Kollmar et al. [57] daraufhin direkt das Wachstum kolorektaler Lebermetastasen nach Pfortaderastligatur. Das Tumolvolumen war initial signifikant reduziert. Ab Tag 14 kam es zu einer Steigerung des Wachstums und Kompensation, sichtbar in der erhöhten PCNA-Rate sowohl der Tumorzellen als auch der Leberzellen. Die Tumorumfänge waren an Tag 21 vergleichbar mit denen der Sham-Gruppe. Ebenso war die Tumorvaskularisierung an Tag 14 signifikant (ca. 50%) reduziert, bis Tag 21 jedoch komplett rekompensiert [57]. Die Daten der vorliegenden Studie stimmen hiermit überein. An Tag 13 war die Anzahl der PECAM-1-positiven Zellen ebenfalls um 50% reduziert.

Die vorliegende Studie zeigt in der PBL Sham-Gruppe ein um 50% gesteigertes Tumorwachstum bereits 13 Tage nach Pfortaderastligatur. Dies verdeutlicht die Schwierigkeit, das genaue Zeitfenster einer Tumorprogression nach Pfortaderastligatur vorauszusagen. Unterstrichen wird zudem die Notwendigkeit einer Proliferationskontrolle unter Pfortaderastligatur.

Trotz der anatomisch identischen Feinarchitektur der Rattenleber mit der menschlichen Leber gibt es einen entscheidenden Unterschied [16]. Die Rattenleber hat eine kleeblattförmige Lappung, wohingegen die humanen Leberlappen direkt an einander grenzen. In der humanen Leber besteht somit die Gefahr einer Ausbreitung der Tumorzellen bzw. Metastasen in ein angrenzendes Segment bzw. Lappen. Theoretisch ist so auch eine Ausbreitung zwischen ligierten und nicht-ligierten Leberlappen möglich. Das unterstreicht erneut die Dringlichkeit, Möglichkeiten der Proliferationshemmung unter Pfortaderastligatur zu finden.

Basierend auf diesem Hintergrund war es ein Ziel dieser Studie, die beschriebene Wachstumssteigerung der Metastasen im ligierten Leberlappen durch die Gabe von Temsirolimus zu inhibieren. Die Ultraschallmessungen zeigten, dass das Tumorwachstum nach einer einmaligen Dosis nicht nur komplett inhibiert, sondern sogar im Vergleich zum Ausgangswert signifikant reduziert werden konnte. Gerade durch die HABR des ligierten Lappens erscheint die Applikation des Medikaments über den hepato-arteriellen Ast als interessanter und sinnvoller Ansatz.

#### **8.1.4. Leberteileresektion**

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie war es, das Wachstumsverhalten von Metastasen nach Leberresektion zu analysieren. Im Vergleich zur Sham-Gruppe wurde auch hier die Wirkung von Temsirolimus auf das Tumolvolumen gemessen.

Der derzeitige Goldstandard in der Behandlung von Lebermetastasen ist nach wie vor die vollständige Resektion der Läsionen [85]. Trotzdem kommt es bei ca. 60-70% der operierten Patienten zu einem Rezidiv [1, 78]. Ausgedehnte Leberresektionen sind assoziiert mit einer massiven Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und proangiogenen Faktoren wie Hepatozyten spezifische epidermale und endotheliale Wachstumsfaktoren (HGF, EGF, VEGF) [74, 118]. Neben der Regeneration des Parenchyms können diese Faktoren auch das Wachstum klinisch inapparenter Mikrometastasen und zirkulierender Tumorzellen anregen. Dies stellt einen potentiellen Mechanismus für die Entstehung von Rezidiven nach Resektion dar [77]. Mehrere Studien haben dies bereits gezeigt. Rupertus et al. [94] konnten in einem tierexperimentellen Versuch nach einer 70%-igen Hepatektomie eine signifikante Steigerung der Tumorzellausbreitung, der Neovaskularisierung und des extrahepatischen Tumorwachstums feststellen. Zudem korrelierte das Ausmaß der Resektion positiv mit dem Metastasenwachstum. Diese erhöhte Wachstumsrate bestätigte sich auch in der vorliegenden Studie. Der Vergleich der Kontroll-Gruppen untereinander zeigte die größte Wachstumssteigerung der Metastasen zwischen Tag 10 und 13 nach 70%-iger Leberteilresektion.

Diese Tatsache hebt den klinischen Nutzen hervor, potente adjuvante Chemotherapie-Regimes zu finden, um dies in Zukunft zu verhindern. Eine 2009 veröffentlichte Studie von Rupertus et al. [93] beschreibt eine interessante Strategie, dass durch mTOR-Inhibition die Rezidivrate nach Leberteilresektion gesenkt werden kann. Dies wurde in dieser Studie aufgegriffen, um die Wirkung von Temsirolimus zusätzlich durch die Gabe über den arteriellen Schenkel auf das Tumolvolumen zu untersuchen. Aufgrund der nachweislich dominierenden arteriellen Versorgung der Lebermetastasen könnte so die Wirkung potenziert werden.

### **8.1.5. Hepato-arterielle Infusion**

Als Applikationsform des Medikaments Temsirolimus wurde die hepato-arterielle Infusion nach bereits beschriebenem Procedere gewählt. Die HAI ist eine lokoregionäre Chemotherapie mit dem Ziel der Erhöhung der lokalen Konzentration des Therapeutikums am Wirkort, um die potentielle zytotoxische und tumorderstruktive Wirkung zu steigern [20]. Die Effektivität der HAI beruht auf dem Wissen, dass die Versorgung kolorektaler Lebermetastasen hauptsächlich auf dem arteriellen System basiert und weniger über das venöse Blut der Pfortader gewährleistet wird. Im Gegensatz hierzu basiert der Blutfluss des gesunden Leberparenchyms zu 70% auf dem der Pfortader und wird nur zu 30% arteriell gespeist [14, 16].

Die arteriellen Äste zweigen sich primär in den sogenannten peribiliären Plexus auf. Dieser drainiert Blut in die efferenten Gefäße der Metastasenversorgung. Nach der Nährstoffabgabe fließt das Blut in die Lebersinusoide und Portalvenen ab. Das venöse Blut der Pfortader fließt über die Glisson Trias direkt in die Lebersinusoide ohne in den peribiliären Plexus zu drainieren. Das bewiesen Gonda et al. [42], in dem sie elektronenmikroskopisch sowohl das arterielle, als auch das venöse Gefäßbett in Leber und Lebermetastasen untersuchten. Hierfür wurde Harz in die Gefäßsysteme appliziert, welches nach Aushärtung elektronenmikroskopisch sichtbar wird. Es zeigte sich bereits bei Metastasen mit einer Größe von 3 bis 7mm ein gut entwickeltes arterielles System [42]. Bekannt ist, dass Primärtumore sowie Metastasen ab einer Größe von 1-2mm<sup>3</sup> der Ausbildung eines Gefäßsystems bedürfen, um eine adäquate Blutversorgung zu gewährleisten [32]. Eine nachweisbare Neovaskularisierung der Metastasen zeigten Gonda und Mitarbeiter ab einer Größe von 300µm im Durchmesser. Bei der in der aktuellen Studie angewandten Implantationstechnik beträgt die durchschnittliche Größe der Tumoren gemäß Sperling et al. [99] 5-10mm. Die Untersuchung des mit Harz markierten portalvenösen Gefäßbettes zeigte hingegen keinerlei Gefäßneubildungen, unabhängig von der Tumorgöße [41]. Diese

Ergebnisse können einen Vorteil der HAI gegenüber der systemischen Applikation eines Chemotherapeutikums erklären. Basierend auf den beschriebenen Perfusionsverhältnissen, kommt es so zu einer möglichen Verlängerung der Expositionszeit des Medikaments in den Tumorgefäßen und einer möglichen Steigerung des zytotoxischen Effekts.

Des Weiteren kann die HAI, im Gegensatz zur intravenösen Applikation, zu einer erhöhten Wirkstoffextraktion durch einen hohen „first-pass-effect“ führen. Gleichzeitig werden systemische Nebenwirkungen reduziert. Medikamente mit einem hohen „first-pass-effect“ können so noch effektiver wirken. [41, 75, 84] Der in dieser Studie verwendete m-TOR Inhibitor Temsirolimus wird über das Cytochrom P450 3A4 hepatisch metabolisiert [87]. Ein hoher „first-pass-effect“ ist somit anzunehmen.

Mehrere Studien der Arbeitsgruppe Sperling et al. [98,99] konnten die Überlegenheit einer hepato-arteriellen Infusion gegenüber einer systemischen Applikation zeigen. Die Versuche von Sperling et al. [98,99] wurden nach dem in dieser Studie beschriebenen Modell durchgeführt. Eine 2011 veröffentlichte Arbeit zeigte nach einer Einmal-Gabe von Bevacizumab und Oxaliplatin über hepato-arterielle Infusion, analog des hier beschriebenen Modells, eine Reduktion der Tumorgöße um ca. 20%. Die Auswertung der Vergleichsgruppe nach systemisch gegebener gleicher Dosis zeigte keine Inhibition des Wachstums im Vergleich zur Sham-Gruppe [99]. Ein ähnliches Ergebnis erbrachte ein Folgeversuch. Hier war wiederum die lokoregionale Applikation (HAI) der systemischen Gabe deutlich überlegen. Die Kombination aus Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin gegeben an Tag 10 des Experiments erbrachte eine Reduktion des Metastasenwachstums im Vergleich zur systemischen Applikation und der Sham-Gruppe [98]. Basierend auf den Vorversuchen durch Sperling und Mitarbeiter [98,99] und der deutlichen Überlegenheit der hepato-arteriellen Infusion wurde in der aktuellen Studie auf einen systemischen Kontrollarm verzichtet.



### **8.1.6. Temsirolimus**

Die perioperative Chemotherapie hat das Outcome von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen verbessert. Unzureichende Evidenz besteht jedoch über die optimale Applikationsform und das Chemotherapieregime, mit welchem das beste Gesamtüberleben zu erzielen ist [85]. In diesem Kontext wurden neue zytotoxische Medikamente mit antiproliferativer und antiangiogener Wirkung in verschiedenen Studien untersucht [113]. Einer dieser Stoffe ist das Rapamycinderivat Temsirolimus (CCI-779), das zu einer Hemmung der Proteinkinase mTOR führt. Als Teil des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Singalweges können über diese Hemmung sowohl Zellwachstum als auch Überleben und Angiogenese reguliert werden. Präklinische Studien zeigten antiproliferative und antiangiogene Effekte nach systemischer Administration des mTOR-Inhibitors Rapamycin [42, 93].

Der aktivierte mTOR-Komplex phosphoryliert die S6-Kinase 1 (p70S6K) und den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (eIF4E-binding-protein1). Diese beiden nachgeschalteten Faktoren haben entscheidenden Einfluss auf die mRNA Translation und somit auf die Proteinbiosynthese [23, 34, 96, 114]. Die Überexpression von 4EBP1 und eIF4E in Kolontumoren geht zudem mit einer schlechten Prognose einher [82]. Besonders in Tumoren führt die mTOR-getriggerte Aktivierung von p70S6K zu einer vermehrten Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF). Durch progrediente Größenzunahme und der daraus resultierenden insuffizienten Blutversorgung kommt es im Tumorparenchym zu einer Hypoxie und folglich zu einer erhöhten Expression des hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ). Dies führt zu einer Aktivierung von Endothelzellen, was eine verstärkte Tumorangiogenese bewirkt [120]. mTOR-Inhibitoren können somit über die Modulation der mTOR Aktivität in den Prozess der Neovaskularisierung von Tumoren eingreifen [23].

Guba et al. [43] bewiesen 2002 einen antiproliferativen Effekt von Rapamycin auf verschiedene Tumore im Vergleich zu Cyclosporin A. Durch die verminderte VEGF-

Produktion und Blockade der VEGF-induzierten, vaskulären Endothelzellstimulation zeigten sich bei einem Mausmodell mit kolorektalen Lebermetastasen in der Rapamycin-behandelten Gruppe kleine und schlecht vaskularisierte Tumorareale. Anschließende in vivo und vitro Versuche ergaben eine verminderte VEGF-Sekretion bzw. endogene Produktion aufgrund einer reduzierten VEGF-mRNA-Produktion. Sie zeigten, dass der antiproliferative Effekt auf einer Hemmung der Endothelzellen beruht, und nicht direkt auf die Tumorzellen, wie zuerst vermutet. Dies erklärt die Wirkung von Rapamycin vor allem bei beginnender Neovaskularisierung des Tumors [43]. 2005 stellten Guba et al. [44] ein gesteigertes Vorkommen von Thrombosen begrenzt auf die Tumorareale nach Applikation von Rapamycin fest. Das vaskuläre Netzwerk des Tumors wird geschädigt und die Durchblutung so signifikant verringert, was wiederum in einer Wachstumshemmung resultiert. Es zeigte sich, dass die TF-Protein-(Tissue Factor)-Expression durch positive VEGF-mitogen-activated-protein (MAP)-Kinasen Signaltransduktion in Endothelzellen gesteigert war. Diese TF-abhängige VEGF-MAP-Kinase wird durch mTOR negativ reguliert. Da dies durch Rapamycin aufgehoben wird, führt VEGF und Rapamycin zu einer gesteigerten TF-Protein Expression und wirkt somit prokoagulatorisch. Dieser selektive Effekt auf das Tumorparenchym wird durch die erhöhte lokale VEGF Produktion erklärt. Rapamycin beeinträchtigt somit zudem neben dem antiangiogenen Effekt die Funktion von Blutgefäßen. Über mTor-Inhibition wird so nicht nur Tumorstadium gehemmt sondern auch eine Regression bestehender Läsionen erzielt [42]. Diese Effekte konnten wir in der vorliegenden Studie ebenfalls zeigen. Dies lässt darauf schließen, dass eine Therapie mit Rapamycin eine bessere Wirkung auf bereits vaskularisierte Tumoren erzielen kann, als bei kleinen, nicht vaskularisierten Läsionen.

Bei den meisten bisher untersuchten Tumorentitäten, wie dem Nierenzellkarzinom, neuroendokrinen Tumoren des Pankreas, Sarkomen, Lebertumoren, dem kolorektalen Karzinom, und nicht-soliden Tumoren wie das Non-Hodgkin-Lymphom, führte die mTOR-Inhibition zu einer Hemmung des Tumorstadiums [112]. Es konnte aber

keine Regression erreicht werden [82]. Die Applikation der Rapaloga erfolgte der Literatur zufolge bisher jedoch überwiegend systemisch [6, 7, 21, 39, 70, 106]. In der vorliegenden Studie konnte nach einmaliger Gabe von Temsirolimus über HAI, selbst nach Wachstumsinduktion durch Leberteilresektion und Pfortaderastligatur, eine Regression der Metastasen erzielt werden. Das weist darauf hin, dass sich die Wirkung von Temsirolimus gerade bei Wachstumsstimulation durch äußere Reize mit Ausschüttung von Zytokinen potenzieren lässt. Die gewählte Dosis Temsirolimus orientiert sich an den Vorgaben der klinisch üblichen Konzentrationen. Das in diesem Modell gewählte Beobachtungsintervall von 3 Tagen erklärt sich durch die Halbwertszeit von Temsirolimus von ca. 57-63h.

### **8.1.7. Untersuchungstechnik**

Zur Evaluation des Tumolvolumens kam im Verlauf des Versuchs ein hochauflösender 3D-Ultraschall zum Einsatz. Die entscheidenden Vorteile liegen hier in der Wiederholbarkeit und Schnelligkeit dieser Untersuchung, zudem ist sie nicht invasiv. Die Möglichkeit, das Wachstum der entstehenden Metastasen sowie ihren Verlauf genau zu analysieren, eröffnet neue Möglichkeiten der in vivo Analyse etablierter Metastasen im experimentellen Bereich. Dreidimensionale Aufnahmen, anders als konventionelle zweidimensionale Aufnahmen, spiegeln die Anatomie detailgetreu im Raum wider.

2010 veröffentlichten Laschke et al. [62] eine Studie über eine 3D-Ultraschall-in-vivo-Analyse von Endometrioseläsionen in Mäusen. In diesem Rahmen verglichen sie die Resultate der Ultraschallmessung mit denen einer manuellen Messung der Endometrioseherde via Schublehre und bewiesen mit einer Korrelation von  $r = 0.874$  eine gute Übereinstimmung. Die Ergebnisse der histologischen Volumenevaluation waren im Durchschnitt vermindert, was auf Grund der Fixierungstechnik in Formalin

und dem damit verbundenen Flüssigkeitsverlust des Gewebes zu erklären war [60, 62].

Der Versuchsaufbau der vorliegenden Studie ermöglicht eine nicht invasive Untersuchungstechnik zur Verlaufskontrolle des Metastasenwachstums. Um die Auswirkung von Temsirolimus zu evaluieren, sollte im Rahmen der notwendigen Vermessung der Tumervolumina keine zusätzliche Belastung für die Versuchstiere entstehen. Die intraoperative 3D-Sonographie erfüllt diese Bedingungen. Wie bereits beschrieben wurde jedem Versuchstier an Tag 0 Tumorzellen in den linken Leberlappen injiziert. Die hierdurch entstandene solitäre Metastase war mit Ultraschall zuverlässig zu detektieren. Die Applikation von i.v. Kontrastmittel, wie bei anderen bildgebenden Verfahren erforderlich, war nicht notwendig. Somit war es möglich, das Experiment um eine potentielle Einflussgröße (Kontrastmittel) zu verringern.

Wie alle Ultraschalluntersuchungen setzt auch dieses Untersuchungsverfahren einen erfahrenen Untersucher voraus. Die korrekte Vermessung und Steuerung des Ultraschallkopfes mit der anschließenden Auswertung muss standardisiert durchgeführt werden, um valide Ergebnisse und eine statistische Vergleichbarkeit zu schaffen.

Im klinischen Alltag kommt als letzter Schritt der bildgebenden Diagnostik eine intraoperative Ultraschall-Untersuchung der Leber zum Einsatz. Die hohe Sensitivität von ca. 98% macht diese Untersuchung zu einer wichtigen Staging-Untersuchung und zeigt die Anatomie und Lage von Metastasen zu umliegenden Strukturen und Gefäßen. Im klinischen Alltag ist der Chirurg oftmals mit einer Diskrepanz der präoperativen Bildgebung und der intraoperativen Lage von Läsionen konfrontiert [86]. Cervone et al. [18] verglichen über einen Zeitraum von 2 Jahren das Ergebnis präoperativer Staging Untersuchungen von Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms an 23 Patienten. Es wurde bei allen Patienten ein intraoperativer Ultraschall

durchgeführt. In 44% der Fälle wurde das präoperativ festgelegte Prozedere auf Grund der intraoperativen Ultraschalluntersuchung modifiziert. Die Studie zeigte eine Sensitivität von 80% für das Auffinden von intrahepatischen Läsionen für den intraoperativen Ultraschall. Die präoperative CT-Untersuchung erbrachte nur eine Sensitivität von 60% [18].

Conlon und Kollegen [22] veröffentlichten 2003 eine retrospektive Studie, in welcher sie die Relevanz der intraoperativen Ultraschalluntersuchung mit dem Ergebnis einer vorangegangenen MRT-Untersuchung, der bimanuellen Palpation und der histologisch aufbereiteten Resektion verglichen. Der intraoperative Ultraschall lieferte bei 47% der Patienten zusätzliche Informationen, die sogar in 18% der Fälle eine Änderung des operativen Vorgehens zur Folge hatte. 15% der Untersuchten erhielten so eine ausgedehnte Leberteilektomie. Auch diese Arbeitsgruppe kommt zu dem Schluss, dass trotz des stetigen Fortschritts der präoperativen Diagnostik der intraoperative Ultraschall eine essentielle und effektive Methode vor jeder Resektion von Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms ist, gerade auch auf Grund der Möglichkeit der „real-time“-Visualisierung von Anatomie und Lagebeziehungen [22].

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass mit der Ultraschalluntersuchung gut reproduzierbare, untereinander vergleichbare Ergebnisse zu erzielen sind, und dass diese Technik im tierexperimentellen Versuchsaufbau den klinischen Standard realistisch widerspiegelt. Außerdem ist die Ultraschalluntersuchung eine nicht-invasive und kostengünstige Methode.

## **8.2. Diskussion der Ergebnisse**

Ziel der Studie war es die Wirkung des Rapamycinderivats Temsirolimus in Rahmen einer hepato-arteriellen Infusion auf etablierte kolorektale Lebermetastasen zu

beurteilen. Zusätzlich wurde die Wirkung nach Wachstumsstimulation in Form von Leberteileresektion und Pfortaderastligatur untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Volumenzunahme der Tumoren der PBL und Phx Sham-Gruppe. Hier wird die Wachstumsinduktion deutlich. Interessant ist der Vergleich der Tumorumfänge nach Applikation von Temsirolimus mit der jeweiligen Sham-Gruppe. Die Auswertung ergab eine Hemmung des Wachstums in allen Rapa-Gruppen nach einer einmaligen Dosis Temsirolimus über einen Zeitraum von 3 Tagen. Neben der kompletten Wachstumshemmung durch Temsirolimus konnte die Größe der Metastasen der PBL und Phx Rapa-Tiere gegenüber dem Ausgangswert sogar reduziert werden. Am deutlichsten zeigte sich dies in der Phx-Gruppe. So ergab die sonographische Auswertung, dass das Wachstum von ca. +60% (Phx Sham) in der Kontrollgruppe durch die HAI auf -8% (Phx Rapa) reduziert werden konnte. Dies lässt vermuten, dass die Wirkung von Temsirolimus nach einem Wachstumsreiz sogar noch potenziert wird. Eine Erklärung liefern hier Guba et al. [43,44], die eine antiangiogene sowie eine prothrombotische Wirkung durch Rapamycin nachwiesen. Die histologische Auswertung der Angiogenese der vorliegenden Studie unterstützt diese Ergebnisse. Es konnte bei allen Rapa-Gruppen eine signifikante Reduktion der PECAM-1-positiven Zellen gefunden werden.

2005 berichteten Guba et al. [44] in einem tierexperimentellen Versuch über ein verstärktes Vorkommen von Thrombosen bzw. Gefäßschädigungen im Tumorgewebe kolorektaler Lebermetastasen in Mäusen. Dieser prothrombotische Effekt ist vor allem in bereits etablierten Gefäßnetzwerken zu detektieren und hemmt so den weiteren Tumorprogress [43]. In der vorliegenden Studie war das Gefäßnetzwerk in der Sham-Gruppe, gemessen an der Rate der PECAM-1-positiven Zellen, am deutlichsten ausgeprägt. Die Anzahl der PECAM-1-positiven Zellen nach Rapa betrug nur ein Fünftel des Wertes von Sham. Dies lässt den Schluss zu, dass die Hemmung des Tumorwachstums durch Temsirolimus auf einer Schädigung des Tumorgefäßbettes beruht. Denn trotz der deutlichen Erhöhung der Apoptoserate (Caspase-3) in dieser

Gruppe zeigte sich keine Reduktion des Tumolvolumens. Diese Ergebnisse decken sich mit den Schlussfolgerungen von Guba et al. [44], dass Rapamycin eher eine Inhibition als eine Reduktion des Wachstum von etablierten Metastasen bewirkt.

Anders sahen die Ergebnisse nach Wachstumsstimulation aus. Das Tumorwachstum konnte nach Leberteilresektion und Pfortaderastligatur durch die HAI mit Temsirolimus nicht nur gehemmt, sondern das Tumolvolumen konnte sogar reduziert werden. Die PECAM-1 Auswertung der PBL und Phx Rapa-Gruppen zeigte nur halb so viele positive Zellen verglichen mit PBL und Phx Sham. Temsirolimus führte zu einer signifikant reduzierten Neovaskularisierung aller Behandlungsgruppen.

Die Gruppen PBL und Phx Sham wiesen wie bereits beschrieben nur ca. die Hälfte der PECAM-1-positiven Zellen im Vergleich zur Sham-Gruppe auf. Die Tumorumfänge der PBL und Phx Sham-Gruppe waren jedoch größer als die der Sham-Gruppe. Dies lässt darauf schließen dass sich die Vaskularisierung der Tumore zum Zeitpunkt der Organentnahme im Aufbau befand. Ein wichtiger Faktor der Angiogenese ist der vascular endothelial growth factor (VEGF). Obwohl das vaskuläre Netzwerk histologisch noch vermindert erscheint, kann der VEGF bereits verstärkt exprimiert werden [43]. Wie bereits beschrieben blockiert Temsirolimus die VEGF-Expression auf mRNA-Ebene, und hemmt so die Vaskularisierung [44]. Getriggert wird die VEGF-Produktion unter anderem Hypoxie-bedingt durch die Expression von HGF-1. Im Rahmen des Tumorzellwachstums entsteht eine Minderperfusion, welche über die HGF-1 und VEGF-Signalkaskade zu einer Neovaskularisierung führt. In der vorliegenden Studie geht die Reduktion der Tumorumfänge in den PBL- und Phx-Gruppen auch mit einer verminderten Neovaskularisierung einher.

Rupertus et al. [93] konnten bereits 2010 eine Hemmung des Wachstums von kolorektalen Metastasen nach Leberteilresektion durch die Gabe von Rapamycin erzielen. Es zeigte sich eine Reduktion der Angiogenese, der mikrovaskulären

Perfusion sowie der Tumorzellproliferation. Die Folge einer täglichen intraperitonealen Gabe von Rapamycin war eine Reduktion des PCNA-Index der Behandlungsgruppen [93]. Dies bestätigte sich in der vorliegenden Studie in ähnlicher Weise. Zusätzlich zeigte sich jedoch eine tendenzielle Erhöhung der Anzahl Caspase-3-positiver Zellen. Die größte Reduktion des Tumolvolumens nach der Gabe von Temsirolimus wurde wie bereits beschrieben in der Phx Rapa-Gruppe erzielt. Die Gabe von Temsirolimus erfolgte zudem einmalig, anstatt im täglichen Rhythmus wie bei Rupertus et al. [93]. Das unterstreicht den Vorteil der Applikationsweise als hepato-arterielle Infusion nach Leberteileresektion.

Bekannt ist, dass Rapamycin das Tumorwachstum nach Resektion hemmt und zu einer Verzögerung der Leberregeneration führt [76, 93]. Interessanterweise haben wir nach Temsirolimus-Applikation eine tendenziell höhere Proliferationsrate im Leberparenchym aller Gruppen gefunden. Die Ursache dieses Ergebnisses ist unklar. Bekannt ist, dass VEGF zu einer Vasodilatation führt [13]. Rapamycin hemmt die Ausschüttung von VEGF [43] und somit die Vasodilatation [54]. Zudem wurde beschrieben, dass Rapamycin auch eine Vasokonstriktion induzieren kann [104]. Die Applikation von Temsirolimus könnte zu einer leichten Hypoxie im Lebergewebe geführt haben und so eine verstärkte Hypoxie-getriggerte Zellproliferation bewirken. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Proliferationsrate nach Temsirolimusapplikation dar.

Rupertus et al. [92] beschrieben, dass nach Rapamycingabe die Leukozyteninfiltration als Ausdruck einer immunsuppressiven Wirkung vermindert war. Eine Erhöhung der Leukozyteninfiltration ist zum einen Ausdruck einer Entzündung und dient zum anderen auch als Trigger einer vermehrten Angiogenese. Wir haben die Leukozytenakkumulation und -infiltration histologisch intravasal, perivaskulär und parenchymal im Lebergewebe analysiert. Es zeigten sich erwartungsgemäß eher niedrigere Werte in den Sham-Gruppen. Nach hepato-arterieller Infusion (Rapa)



wurden intravasal mehr, perivaskulär weniger Leukozyten aufgefunden. Anders nach Resektion und Ligatur. Hier fanden sich intravasal weniger Leukozyten. Eine schlüssige Aussage kann an Hand der Ergebnisse der vorliegenden Studie aber nicht getroffen werden.

Alle Rapa-Gruppen zeigten in den HE-gefärbten Schnitten eine vermehrte hepatozelluläre Grobscholligkeit und Vakuolisierung des Leberparenchyms. Eine leicht erhöhte hepatozelluläre Schädigung der Phx- und PBL-Gruppen erklärt sich am ehesten als Folge des ausgedehnteren chirurgischen Eingriffs. Die Leberenzyme GOT, GPT und GLDH waren einzig an Tag 13 nach Leberteilresektion und Temsirolimus-Gabe (Phx Rapa) im Vergleich zur korrespondierenden Sham-Gruppe (Phx Sham) erhöht. In der Zusammenschau der Daten konnten wir keine massive Schädigung der Leber nach der hepato-arterieller Infusion von Temsirolimus (Rapa, PBL Rapa, Phx Rapa) zeigen.

Rupertus et al. [93] beschrieben zudem eine verzögerte Wundheilung nach Rapamycin-Gabe und empfehlen Rapamycin nicht in der frühen Phase nach Leberresektion zu geben, um Wundheilungsstörungen zu vermeiden. Dem stimmen wir zu, da auch in unserem Versuch im Intervall von 3 Tagen nach Temsirolimus-Applikation eine instabilere Laparotomienahrt der Versuchstiere im Vergleich zu den Sham-Gruppen bemerkbar war.

Durch das Modell der hepato-arteriellen Infusion wird eine höhere Gewebekonzentration bei gleichzeitiger Reduktion der systemischen Nebenwirkungen erzielt. Die Bestimmung der Blutparameter ergab keinerlei Hinweise auf eine systemisch hämatologische Beeinträchtigung der Tiere.

Auffällig war die histologische Auswertung der Tumoren der PBL-Gruppen. PBL Rapa erreichte den höchsten Apoptoseindex, wohingegen der Index der korrespondierenden PBL Sham-Gruppe nur etwa ein Drittel dessen betrug. Analog

dazu ergab der Proliferationsindex im Tumor den niedrigsten Wert. Dies kann auf der „hepatic arterial buffer response“ beruhen. Durch die Arterialisierung des ligierten Lappens ist die Gabe von Temsirolimus als hepato-arterielle Infusion hier wohl noch wirksamer. In vorangegangenen Versuchen beschrieben Kollmar et al. [56] den Verlauf des Leber- und Tumorwachstums nach Pfortaderastligatur. Es zeigte sich eine maximale Hypertrophie des ligierten Lappens zwischen Tag 7 und 14 und ein verzögertes maximales Wachstum der induzierten kolorektalen Metastase ab Tag 14. Auch die Angiogenese des Tumors (PECAM-1) zeigte diesen „late onset“ und war so an Tag 14 noch um 50% im Vergleich zur Sham-Gruppe reduziert. Das erklärt, warum die Tumorumfänge nach PBL Sham zwar größer als die nach Sham, jedoch kleiner als nach Phx Sham waren. Die Auswertungen von Apoptose und Proliferation jedoch eine bessere Wirksamkeit von Temsirolimus in der PBL Sham-Gruppe zeigten.

### **8.3. Schlussfolgerung**

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass die hepato-arterielle Infusion von Temsirolimus das Tumorwachstum von CC531 kolorektalen Lebermetastasen hemmt. Nach vorausgegangener Wachstumsstimulation durch Leberteilresektion oder Pfortaderastligatur konnte sogar eine im Vergleich zur jeweiligen Sham-Gruppe erreicht werden. Dies zeigt, dass die HAI von Temsirolimus eine interessante Behandlungsstrategie darstellt, um einen Tumorprogress nach Pfortaderastligatur oder Leberteilresektion zu inhibieren.

## 9. LITERATUR

1. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, et al. (2004) Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg.* 239:818-825.
2. Abulkhir A, Limongelli P, Healey AJ, Damrah O, Tait P, Jackson J, et al. (2008) Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg.* 247:49-57.
3. Adam R, Avisar E, Ariche A, Giachetti S, Azoulay D, Castaing D, et al. (2001) Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal. *Ann Surg Oncol.* 8:347-353.
4. Adson MA, Van Heerden JA (1980) Major hepatic resections for metastatic colorectal cancer. *Ann Surg.* 191:576-583.
5. Aller MA, Arias JL, García-Domínguez J, Arias JI, Durán M, Arias J (2008) Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 1(1), 6.
6. Altomare I, Bendell JC, Bullock KE, Uronis HE, Morse MA, Hsu SD, et al. (2011) A phase II trial of bevacizumab plus everolimus for patients with refractory metastatic colorectal cancer. *Oncologist.* 16:1131-1137.
7. Amadori S, Stasi R, Martelli AM, Venditti A, Meloni G, Pane F, et al. (2012) Temsirolimus, an mTOR inhibitor, in combination with lower-dose clofarabine

- as salvage therapy for older patients with acute myeloid leukaemia: results of a phase II GIMEMA study (AML-1107). *Br J Haematol.* 156:205-212.
8. Ansell SM, Inwards DJ, Rowland KM, Jr., Flynn PJ, Morton RF, Moore DF, Jr., et al. (2008) Low-dose, single-agent temsirolimus for relapsed mantle cell lymphoma: a phase 2 trial in the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer.* 113:508-514.
  9. Arnold DS (2010) Kurativer Ansatz für metastasierte kolorektale Karzinome. *Gastroenterologe.* 5:430-436.
  10. Ballou LM, Lin RZ (2008) Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol.* 1:27-36.
  11. Barbaro B, Di Stasi C, Nuzzo G, Vellone M, Giuliente F, Marano P (2003) Preoperative right portal vein embolization in patients with metastatic liver disease. Metastatic liver volumes after RPVE. *Acta Radiol.* 44:98-102.
  12. Barone GW, Gurley BJ, Abul-Ezz SR, Gokden N (2003) Sirolimus-induced thrombotic microangiopathy in a renal transplant recipient. *Am J Kidney Dis.* 42:202-206.
  13. Bates DO, Lodwick D, Williams B (1999) Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. *Microcirculation.* 6:83-96.
  14. Breedis C, Young G (1954) The blood supply of neoplasms in the liver. *Am J Pathol.* 30:969-977.
  15. Broering DC, Hillert C, Krupski G, Fischer L, Mueller L, Achilles EG, et al. (2002) Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J Gastrointest Surg.* 6:905-913.

16. Burkel WE (1970) The fine structure of the terminal branches of the hepatic arterial system of the rat. *Anat Rec.* 167:329-349.
17. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferraresso M, Burra P, Cadrobbi R, et al. (1997) The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol.* 183:477-485.
18. Cervone A, Sardi A, Conaway GL (2000) Intraoperative ultrasound (IOUS) is essential in the management of metastatic colorectal liver lesions. *Am Surg.* 66:611-615.
19. Chen HS, Gross JF (1980) Intra-arterial infusion of anticancer drugs: theoretic aspects of drug delivery and review of responses. *Cancer Treat Rep.* 64:31-40.
20. Cohen AD, Kemeny NE (2003) An update on hepatic arterial infusion chemotherapy for colorectal cancer. *Oncologist.* 8:553-566.
21. Cohen EE, Sharma MR, Janisch L, Llobrera M, House L, Wu K, et al. (2011) A phase I study of sirolimus and bevacizumab in patients with advanced malignancies. *Eur J Cancer.* 47:1484-1489.
22. Conlon R, Jacobs M, Dasgupta D, Lodge JP (2003) The value of intraoperative ultrasound during hepatic resection compared with improved preoperative magnetic resonance imaging. *Eur J Ultrasound.* 16:211-216.
23. Dancy JE (2006) Therapeutic targets: MTOR and related pathways. *Cancer Biol Ther.* 5:1065-1073.
24. de Graaf W, van den Esschert JW, van Lienden KP, van Gulik TM (2009) Induction of tumor growth after preoperative portal vein embolization: is it a real problem? *Ann Surg Oncol.* 16:423-430.

25. de Jong G, Hendriks T, Franssen G, Oyen W, Boerman O, Bleichrodt R (2011) Adjuvant radioimmunotherapy after radiofrequency ablation of colorectal liver metastases in an experimental model. *Eur J Surg Oncol.* 37:258-264.
26. de Jong GM, Aarts F, Hendriks T, Boerman OC, Bleichrodt RP (2009) Animal models for liver metastases of colorectal cancer: research review of preclinical studies in rodents. *J Surg Res.* 154:167-176.
27. Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung öffentlichen Rechts, Im Neuenheimer Feld 280 | 69120 Heidelberg, Internet: [www.dkfz.de](http://www.dkfz.de), E-Mail: [webmaster@dkfz.de](mailto:webmaster@dkfz.de)
28. Doci R, Bignami P, Quagliuolo V, Civalleri D, Simoni GA, Cosimelli M (1990) Continuous hepatic arterial infusion with 5-fluorodeoxyuridine for treatment of colorectal metastases. *Reg Cancer Treat.* 3:13-18.
29. El Zouhairi M, Charabaty A, Pishvaian MJ (2011) Molecularly targeted therapy for metastatic colon cancer: proven treatments and promising new agents. *Gastrointest Cancer Res.* 4:15-21.
30. Elias D, De Baere T, Roche A, Mducreux, Leclere J, Lasser P (1999) During liver regeneration following right portal embolization the growth rate of liver metastases is more rapid than that of the liver parenchyma. *Br J Surg.* 86:784-788.
31. Elias D, Ouellet JF, De Baere T, Lasser P, Roche A (2002) Preoperative selective portal vein embolization before hepatectomy for liver metastases: long-term results and impact on survival. *Surgery.* 131:294-299.
32. Ellis LM, Fidler IJ (1996) Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer.* 32A:2451-2460.

33. Ensminger WD (2002) Intrahepatic arterial infusion of chemotherapy: pharmacologic principles. *Semin Oncol.* 29:119-125.
34. Faivre S, Kroemer G, Raymond E (2006) Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov.* 5:671-688.
35. Fausto N (1991) Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Prog Growth Factor Res.* 3:219-234.
36. Fenster A, Downey DB, Cardinal HN (2001) Three-dimensional ultrasound imaging. *Phys Med Biol.* 46:R67-99.
37. Flieger D, Keller R, Fischbach W (2004) [Palliative treatment for colorectal cancer]. *Internist (Berl).* 45:786-794.
38. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH (1999) Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg.* 230:309-318.
39. Fury MG, Sherman E, Haque S, Korte S, Lisa D, Shen R, et al. (2012) A phase I study of daily everolimus plus low-dose weekly cisplatin for patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 69:591-598.
40. Giacchetti S, Itzhaki M, Gruia G, Adam R, Zidani R, Kunstlinger F, et al. (1999) Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery. *Ann Oncol.* 10:663-669.
41. Gonda T, Ishida H, Yoshinaga K, Sugihara K (2000) Microvasculature of small liver metastases in rats. *J Surg Res.* 94:43-48.

42. Guba M, Koehl GE, Neppl E, Doenecke A, Steinbauer M, Schlitt HJ, et al. (2005) Dosing of rapamycin is critical to achieve an optimal antiangiogenic effect against cancer. *Transpl Int.* 18:89-94.
43. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Geissler EK, et al. (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med.* 8:128-135.
44. Guba M, Yezhelyev M, Eichhorn ME, Schmid G, Ischenko I, Papyan A, et al. (2005) Rapamycin induces tumor-specific thrombosis via tissue factor in the presence of VEGF. *Blood.* 105:4463-4469.
45. Harmantas A, Rotstein LE, Langer B (1996) Regional versus systemic chemotherapy in the treatment of colorectal carcinoma metastatic to the liver. Is there a survival difference? Meta-analysis of the published literature. *Cancer.* 78:1639-1645.
46. Hartmann A, Ruschoff J [Pathology of familial tumor syndromes]. *Pathologe.* 31:410-411.
47. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. (2007) Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 356:2271-2281.
48. Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Battegay EJ (2002) Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *Faseb J.* 16:771-780.



49. Jamison RL, Donohue JH, Nagorney DM, Rosen CB, Harmsen WS, Ilstrup DM (1997) Hepatic resection for metastatic colorectal cancer results in cure for some patients. *Arch Surg.* 132:505-510.
50. Kauffman HM, Cherikh WS, Cheng Y, Hanto DW, Kahan BD (2005) Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies. *Transplantation.* 80:883-889.
51. Kelly H, Goldberg RM (2005) Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J Clin Oncol.* 23:4553-4560.
52. Kemeny NE, Niedzwiecki D, Hollis DR, Lenz HJ, Warren RS, Naughton MJ, et al. (2006) Hepatic arterial infusion versus systemic therapy for hepatic metastases from colorectal cancer: a randomized trial of efficacy, quality of life, and molecular markers (CALGB 9481). *J Clin Oncol.* 24:1395-1403.
53. Kennedy AS, Coldwell D, Nutting C, Murthy R, Wertman DE, Jr., Loehr SP, et al. (2006) Resin 90Y-microsphere brachytherapy for unresectable colorectal liver metastases: modern USA experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 65:412-425.
54. Kim DD, Kleinman DM, Kanetaka T, Gerritsen ME, Nivaggioli T, Weber D, et al. (2010) Rapamycin inhibits VEGF-induced microvascular hyperpermeability in vivo. *Microcirculation.* 17:128-136.
55. Kokudo N, Tada K, Seki M, Ohta H, Azekura K, Ueno M, et al. (2001) Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal vein embolization. *Hepatology.* 34:267-272.

56. Kollmar O, Corsten M, Scheuer C, Vollmar B, Schilling MK, Menger MD (2007) Portal branch ligation induces a hepatic arterial buffer response, microvascular remodeling, normoxygenation, and cell proliferation in portal blood-deprived liver tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292:G1534-1542.
57. Kollmar O, Corsten M, Scheuer C, Vollmar B, Schilling MK, Menger MD (2010) Tumour growth following portal branch ligation in an experimental model of liver metastases. *Br J Surg.* 97:917-926.
58. 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.
59. Konopke R, Saeger HD (2003) [Liver metastases. Diagnosis and therapy]. *Chirurg.* 74:866-884.
60. Körbel C, Menger MD, Laschke MW (2010) Size and spatial orientation of uterine tissue transplants on the peritoneum crucially determine the growth and cyst formation of endometriosis-like lesions in mice. *Hum Reprod.* 25:2551-2558.
61. Kulaylat MN, Gibbs JF (2010) Regional treatment of colorectal liver metastasis. *J Surg Oncol.* 101:693-698.
62. Laschke MW, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Gashaw I, Reinhardt M, Hauff P, et al. (2010) High-resolution ultrasound imaging: a novel technique for the noninvasive in vivo analysis of endometriotic lesion and cyst formation in small animal models. *Am J Pathol.* 176:585-593.
63. Lutt WW (1985) Mechanism and role of intrinsic regulation of hepatic arterial blood flow: hepatic arterial buffer response. *Am J Physiol.* 249:G549-556.

64. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 021-007OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
65. Leonard GD, Brenner B, Kemeny NE (2005) Neoadjuvant chemotherapy before liver resection for patients with unresectable liver metastases from colorectal carcinoma. *J Clin Oncol.* 23:2038-2048.
66. 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.
67. Miyagawa S, Kawasaki S (2001) [Preoperative portal embolization for induction of liver hypertrophy]. *Chirurg.* 72:770-774.
68. Mook OR, Van Marle J, Vreeling-Sindelarova H, Jonges R, Frederiks WM, Van Noorden CJ (2003) Visualization of early events in tumor formation of eGFP-transfected rat colon cancer cells in liver. *Hepatology.* 38:295-304.
69. Mullin EJ, Metcalfe MS, Maddern GJ (2005) How much liver resection is too much? *Am J Surg.* 190:87-97.
70. Naing A, Kurzrock R, Burger A, Gupta S, Lei X, Busaidy N, et al. (2011) Phase I trial of cixutumumab combined with temsirolimus in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 17:6052-6060.
71. Napoli KL, Taylor PJ (2001) From beach to bedside: history of the development of sirolimus. *Ther Drug Monit.* 23:559-586.

72. Noll S, Schaub-Kuhnen S (2001) Praxis der Immunhistochemie. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2000, 1-100.
73. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, Balladur P, Boudjema K, Bachellier P, et al. (1996) Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. Association Francaise de Chirurgie. Cancer. 77:1254-1262.
74. Oe H, Kaido T, Mori A, Onodera H, Imamura M (2005) Hepatocyte growth factor as well as vascular endothelial growth factor gene induction effectively promotes liver regeneration after hepatectomy in Solt-Farber rats. Hepatogastroenterology. 52:1393-1397.
75. Okuno K, Hirai N, Lee YS, Tarabar D, Ueno H, Yasutomi M (1998) Superiority of hepatic arterial infusion in preventing catabolism of 5-FU compared with portal vein infusion revealed by an in vivo <sup>19</sup>F NMR study. Cancer Chemother Pharmacol. 42:341-344.
76. Palmes D, Zibert A, Budny T, Bahde R, Minin E, Keschull L, et al. (2008) Impact of rapamycin on liver regeneration. Virchows Arch. 452:545-557.
77. Panis Y, Ribeiro J, Chretien Y, Nordlinger B (1992) Dormant liver metastases: an experimental study. Br J Surg. 79:221-223.
78. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, Abdalla EK, Andres A, Eng C, et al. (2005) Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. Ann Surg. 241:715-722.
79. Penna C, Nordlinger B (2002) Colorectal metastasis (liver and lung). Surg Clin North Am. 82:1075-1090.

80. Picardo A, Karpoff HM, Ng B, Lee J, Brennan MF, Fong Y (1998) Partial hepatectomy accelerates local tumor growth: potential roles of local cytokine activation. *Surgery*. 124:57-64.
81. Pohlen U, Buhr HJ, Berger G, Ritz JP, Holmer C (2012) Hepatic arterial infusion (HAI) with PEGylated liposomes containing 5-FU improves tumor control of liver metastases in a rat model. *Invest New Drugs*. 30:927-935.
82. Populo H, Lopes JM, Soares P (2012) The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci*. 13:1886-1918.
83. Poston GJ, Adam R, Alberts S, Curley S, Figueras J, Haller D, et al. (2005) OncoSurge: a strategy for improving resectability with curative intent in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 23:7125-7134.
84. Power DG, Healey-Bird BR, Kemeny NE (2008) Regional chemotherapy for liver-limited metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 7:247-259.
85. Quan D, Gallinger S, Nhan C, Auer RA, Biagi JJ, Fletcher GG, et al. (2012) The role of liver resection for colorectal cancer metastases in an era of multimodality treatment: a systematic review. *Surgery*. 151:860-870.
86. Rahusen FD, Cuesta MA, Borgstein PJ, Bleichrodt RP, Barkhof F, Doesburg T, et al. (1999) Selection of patients for resection of colorectal metastases to the liver using diagnostic laparoscopy and laparoscopic ultrasonography. *Ann Surg*. 230:31-37.
87. Reeves DJ, Liu CY (2009) Treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 64:11-25.

88. Richter S, Vollmar B, Mucke I, Post S, Menger MD (2001) Hepatic arteriolo-portal venular shunting guarantees maintenance of nutritional microvascular supply in hepatic arterial buffer response of rat livers. *J Physiol.* 531:193-201.
89. Rocheleau B, Ethier C, Houle R, Huet PM, Bilodeau M (1999) Hepatic artery buffer response following left portal vein ligation: its role in liver tissue homeostasis. *Am J Physiol.* 277:G1000-1007.
90. Rothbarth J, Woutersen RA, Sparidans RW, van de Velde CJ, Mulder GJ (2003) Melphalan antitumor efficacy and hepatotoxicity: the effect of variable infusion duration in the hepatic artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 305:1098-1103.
91. Rous P, Larimore LD (1920) Relation of the Portal Blood to Liver Maintenance: a Demonstration of Liver Atrophy Conditional on Compensation. *J Exp Med.* 31:609-632.
92. Rovers JP, Saarnak AE, Molina A, Schuitmaker JJ, Sterenberg HJ, Terpstra OT (1999) Effective treatment of liver metastases with photodynamic therapy, using the second-generation photosensitizer meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC), in a rat model. *Br J Cancer.* 81:600-608.
93. Rupertus K, Dahlem C, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O (2009) Rapamycin inhibits hepatectomy-induced stimulation of metastatic tumor growth by reduction of angiogenesis, microvascular blood perfusion, and tumor cell proliferation. *Ann Surg Oncol.* 16:2629-2637.
94. Rupertus K, Kollmar O, Scheuer C, Junker B, Menger MD, Schilling MK (2007) Major but not minor hepatectomy accelerates engraftment of extrahepatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis.* 24:39-48.

95. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML (2001) Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int.* 59:3-16.
96. Schmelzle T, Hall MN (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell.* 103:253-262.
97. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, et al. (2008) [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. *Z Gastroenterol.* 46:799-840.
98. Sperling J, Brandhorst D, Schafer T, Ziemann C, Benz-Weisser A, Scheuer C, et al. (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.
99. Sperling J, Schafer T, Ziemann C, Benz-Weißer A, Kollmar O, Schilling MK, et al. (2011) 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.
100. Steele G, Jr., Bleday R, Mayer RJ, Lindblad A, Petrelli N, Weaver D (1991) A prospective evaluation of hepatic resection for colorectal carcinoma metastases to the liver: Gastrointestinal Tumor Study Group Protocol 6584. *J Clin Oncol.* 9:1105-1112.
101. Sullivan RD, Norcross JW, Watkins E, Jr. (1964) Chemotherapy of Metastatic Liver Cancer by Prolonged Hepatic-Artery Infusion. *N Engl J Med.* 270:321-327.

102. Tancredi T, McCuskey PA, Kan Z, Wallace S (1999) Changes in rat liver microcirculation after experimental hepatic arterial embolization: comparison of different embolic agents. *Radiology*. 211:177-181.
103. Tashiro S (2009) Mechanism of liver regeneration after liver resection and portal vein embolization (ligation) is different? *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 16:292-299.
104. Togni M, Windecker S, Cocchia R, Wenaweser P, Cook S, Billinger M, et al. (2005) Sirolimus-eluting stents associated with paradoxical coronary vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol*. 46:231-236.
105. Trotter JF (2003) Sirolimus in liver transplantation. *Transplant Proc*. 35:193S-200S.
106. Vansteenkiste J, Solomon B, Boyer M, Wolf J, Miller N, Di Scala L, et al. (2011) Everolimus in combination with pemetrexed in patients with advanced non-small cell lung cancer previously treated with chemotherapy: a phase I study using a novel, adaptive Bayesian dose-escalation model. *J Thorac Oncol*. 6:2120-2129.
107. Vauthey JN, de Marsh RW, Cendan JC, Chu NM, Copeland EM (1996) Arterial therapy of hepatic colorectal metastases. *Br. J. Surg*. 83: 447-455.
108. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 28:721-726.
109. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E (2005) mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol*. 16:525-537.



110. Vogl TJ, Mack MG, Eichler K, Zangos S, Naguib NN, Gruber-Rouh T (2010) [Chemoperfusion and embolization in the treatment of liver metastases]. *Rofo*. 183:12-23.
111. Vogl TJ, Zangos S, Balzer JO, Thalhammer A, Mack MG (2002) [Transarterial chemoembolization of liver metastases: Indication, technique, results]. *Rofo*. 174:675-683.
112. Wander SA, Hennessy BT, Slingerland JM (2011) Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest*. 121:1231-1241.
113. Wang CC, Li J (2012) An update on chemotherapy of colorectal liver metastases. *World J Gastroenterol*. 18:25-33.
114. Wang X, Proud CG (2006) The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)*. 21:362-369.
115. Weinreich DM, Alexander HR (2002) Transarterial perfusion of liver metastases. *Semin Oncol*. 29:136-144.
116. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M (1986) Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol*. 150:195-203.
117. Wickremesekera JK, Cannan RJ, Stubbs RS (2000) Hepatic artery access ports: recognizing and avoiding the problems. *Aust N Z J Surg*. 70:496-502.
118. Yoon SS, Kim SH, Gonen M, Heffernan NM, Detwiller KY, Jarnagin WR, et al. (2006) Profile of plasma angiogenic factors before and after hepatectomy for colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg Oncol*. 13:353-362.

119. Zhang YJ, Dai Q, Sun DF, Xiong H, Tian XQ, Gao FH, et al. (2009) mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 16:2617-2628.
120. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, et al. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 60:1541-1545.

## 10. ANHANG

### 10.1. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AKT	V-akt murine thymoma viral oncogene
ANOVA	One-way analysis of variance
ARCC-Studie	Advanced Renal Cell Carcinoma-Studie
BE	Basenüberschuss (base excess)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAE	AS-D Chloracetatesterase
Caspase	cysteine-aspartic proteinase
CCI-779	Temsirolimus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
d.h.	das heißt

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EMA	Europäische Zulassungsagentur für Arzneimittel
et al.	und andere
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetal calf serum
FKBP12	FK binding protein 12
g/dl	Gramm pro Deziliter
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HABR	Hepatic arterial buffer response
HAI	Hepato-arterielle Infusion
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom

HPF	High power field
IgG	Immunglobulin G
i.v.	intravenös
K-RAS	V-Ki-ras2 Kristen rat sarcoma viral Oncogene Homolog
LDH	Laktatdehydrogenase
MAP	Mitogen-activated protein
MHz	Mega Hertz
min	Minute
mLST8	LST8/G-protein
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
mSIN1	Mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1
mTOR	Mammilian Target of Rapamycin
mTORC1	Raptor = regulatory associated protein of mTOR
mTORC2	Rictor = rapamycin-insensitive companion of mTOR
MW	Mittelwert
NaCl	Natrium-Chlorid

p70S6K	Protein70 S6 kinase 1
PaCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PaO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PBL	Portal branch ligation
PBS	Phosphat buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
Phx	Partial Hepatectomy
PIP3	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
PTPE	Perkutane transhepatische Portalvenen-Embolisation
PVE	Portalvenen-Embolisation
Rapa	Rapamycin
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SD	Standardabweichung
SIRT	Selektive interne Radiotherapie
TACE	Transarterielle Chemo-Embolisation

TIPE	Transileocolische Portalvenen-Embolisation
TSCII	Tuberons sclerosis complex II
U/min	Internationale Units pro Minute
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
4E-BP1	4E (eIF-4E) binding protein 1
5-FU	5-Fluorouracil
°C	Grad Celsius

## **11. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung während den Versuchen und für die Möglichkeit der Durchführung der Versuche am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes.

Meinem Betreuer Dr. Jens Sperling danke ich für die exzellente Betreuung während der Versuche, sowie beim Schreiben und Korrigieren dieser Arbeit. Einzig durch die gute Organisation der Arbeitsgruppe konnten die Versuche in dem geplanten Zeitrahmen fertiggestellt werden.

Den Mitarbeitern der experimentellen Chirurgie für ihre tatkräftige Unterstützung, besonders Frau Janine Becker für die Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Präparate; außerdem Frau Dr. rer. nat. Claudia Scheuer für die Hilfe bei der Vorbereitung der Tumorzellen, Frau Dr. med. vet. Christine Körbel für die Betreuung bei der Durchführung des 3D-Ultraschalls und Frau Elisabeth Gluding für die Unterstützung bei der Betreuung und Nachsorge der Tiere.

Anna Benz-Weißer für ihre Hilfe während des gesamten Versuchs.

Besonders bedanken möchte ich mich zudem bei meiner Familie, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer unterstützt hat.



## 12. PUBLIKATIONEN

Sperling J, Ziemann C, Gittler A, Benz-Weißer A, Menger M.D, Kollmar O (2013)

Hepatic arterial infusion of temsirolimus inhibits tumor growth of colorectal rat liver metastases even after a growth stimulating procedure like liver resection.

J Surg Res 185: 587-594

Sperling J, Ziemann C, Gittler A, Benz-Weißer A, Menger MD, Kollmar O (2015)

Tumour growth of colorectal rat liver metastases is inhibited by hepatic arterial infusion of the mTOR-inhibitor temsirolimus after portal branch ligation.

Clin Exp Metastasis 32: 313-21