

Aus dem Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie  
Universität des Saarlandes  
Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. Michael D. Menger

**Einfluss von Antikoagulantien auf das Tumorwachstum extrahepatischer kolorektaler  
Metastasen**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2020**

vorgelegt von: Stephanie Wahl  
geb. am: 21.09.1989 in Saarbrücken-Dudweiler

Tag der Promotion: 13.04.2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Prof. Dr. med. Hermann Eichler

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	4
2	Einleitung .....	7
2.1	Das kolorektale Karzinom .....	7
2.1.1	Definition.....	7
2.1.2	Epidemiologie .....	7
2.1.3	Ätiologie und Pathogenese .....	9
2.1.4	Histologische Einteilung .....	9
2.1.5	Therapie des kolorektalen Karzinoms .....	10
2.1.6	Metastasierung.....	11
2.2	Kolorektale Karzinome und Thromboserisiko .....	13
2.3	Tumorwachstum und Angiogenese.....	14
2.4	Hämostase und Thrombose .....	14
2.5	Heparine .....	15
2.6	Die Bedeutung der Heparine in der Tumorthherapie.....	16
2.7	Acetylsalicylsäure .....	18
2.8	Die Bedeutung der Acetylsalicylsäure in der Tumorthherapie .....	18
2.9	Ziele der Studie.....	21
3	Material und Methodik.....	22
3.1	Zellbiologische Methoden.....	22
3.1.1	Tumorzelllinie .....	22
3.1.2	Kultivierung und Vermehrung .....	22
3.1.3	Herstellung der Zellpellets.....	23
3.2	Tierexperimentelles Versuchsvorhaben.....	23
3.2.1	Versuchstiere.....	23
3.2.2	Das Modell der Rückenhautkammer .....	23
3.2.3	Narkose .....	24

3.2.4	Präparation der Rückenhautkammer .....	25
3.2.5	Implantation der Tumorzellen .....	30
3.3	Experimentelles Protokoll .....	31
3.4	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	32
3.4.1	Technik und Durchführung .....	32
3.4.2	Auswertung der Videodateien .....	35
3.5	Histologie und Immunhistochemie .....	36
3.5.1	Herstellung der Gewebeproben .....	36
3.5.2	Auswertung .....	38
3.6	Statistik .....	38
4	Ergebnisse .....	39
4.1	Enoxaparin-Natrium .....	39
4.1.1	Tumorwachstum .....	39
4.1.2	Tumorangiogenese .....	40
4.1.3	Tumorzellproliferation und Tumorzellapoptose .....	42
4.2	Fondaparinux .....	44
4.2.1	Tumorwachstum .....	44
4.2.2	Tumorangiogenese .....	44
4.2.3	Tumorzellproliferation und Tumorzellapoptose .....	46
4.3	Tinzaparin-Natrium .....	48
4.3.1	Tumorwachstum .....	48
4.3.2	Tumorangiogenese .....	48
4.3.3	Tumorzellproliferation und Tumorzellapoptose .....	51
4.4	Acetylsalicylsäure .....	52
4.4.1	Tumorwachstum .....	52
4.4.2	Tumorangiogenese .....	52
4.4.3	Tumorzellproliferation und Tumorzellapoptose .....	54
5	Diskussion .....	56

5.1	Diskussion des tierexperimentellen Versuchsmodells.....	56
5.2	Enoxaparin-Natrium und Tumorwachstum .....	57
5.3	Enoxaparin-Natrium und Tumorangiogenese.....	61
5.4	Fondaparinux und Tumorwachstum.....	63
5.5	Fondaparinux und Tumorangiogenese .....	64
5.6	Tinzaparin-Natrium und Tumorwachstum.....	65
5.7	Tinzaparin-Natrium und Tumorangiogenese .....	67
5.8	Acetylsalicylsäure und Tumorwachstum.....	68
5.9	Acetylsalicylsäure und Tumorangiogenese .....	71
5.10	Schlussfolgerung.....	75
6	Literaturverzeichnis.....	76
7	Abkürzungsverzeichnis.....	84
8	Publikationen.....	87
9	Dank.....	88
10	Lebenslauf.....	89

## 1 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom zählt neben den Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zu den häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen der Bundesrepublik Deutschland. Im Jahr 2016 erkrankten 58.290 Menschen an einem kolorektalen Karzinom. Die Prognose hat sich in den letzten 20 Jahren deutlich verbessert. Dennoch sind ca. 20% der Betroffenen bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung von synchronen Fernmetastasen betroffen. Hauptmetastasierungsort kolorektaler Karzinome ist die Leber. Da auch heute nur 15-20% der synchronen und metachronen Fernmetastasen in kurativer Absicht reseziert werden können, bedarf es zur Verbesserung des Outcomes von Patienten in einem metastasierten Stadium der Entwicklung neuer Therapiestrategien. Patienten mit kolorektalen Karzinomen weisen aufgrund eines tumorinduzierten hyperkoagulativen Stadiums ein erhöhtes Risiko für venöse Thrombembolien auf. Das vermehrte Auftreten von thrombembolischen Komplikationen bedingt eine erhöhte Mortalität und Morbidität der Patienten. Sind venöse Thrombembolien aufgetreten, werden die Patienten zunächst mit niedermolekularen Heparinen therapiert. Die bisherigen Ergebnisse der Literatur postulieren, dass die niedermolekularen Heparine und die Acetylsalicylsäure antitumoröse Eigenschaften aufweisen. Allerdings war der antitumoröse Effekt in den meisten der vorausgegangenen Studien nicht das primäre Ziel der Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkung der niedermolekularen Heparine Enoxaparin-Natrium, Fondaparinux und Tinzaparin-Natrium sowie der Acetylsalicylsäure auf das Wachstum, die Tumorzellproliferation, die Angiogenese und die Apoptose GFP-transfizierter CT-26.WT Kolonkarzinomzellen im Rückenhautkammermodell der Maus. Der Kontrollgruppe wurde analog zur täglichen Medikamentenapplikation eine äquivalente Menge 0,9% Kochsalzlösung verabreicht. Die Tumore wurden an den Tagen 0, 5, 8, 11 und 14 intravitalmikroskopisch untersucht. Gemessen wurden der Tumorumfang sowie die Kapillardichte in der Tumorperipherie und im Tumorzentrum. Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurden ergänzend immunhistochemische Gewebeuntersuchungen zur Evaluation der Tumorzellproliferation, der Kapillarisierung sowie der Apoptose durchgeführt. Für die niedermolekularen Heparine Fondaparinux, Tinzaparin-Natrium sowie für die Acetylsalicylsäure konnte eine teils signifikante Reduktion der Tumorkapillardichte nachgewiesen werden. Eine Therapie mit Tinzaparin-Natrium führte zudem zu einer Hemmung der Tumorzellproliferation. Durch eine tägliche Applikation von 85mg/kg Acetylsalicylsäure konnte im Vergleich zu einer Applikation von 18mg/kg Acetylsalicylsäure eine Steigerung der Apoptose erreicht werden. Trotz der beobachteten Hemmung der Zellproliferation, der Angiogenese und der Steigerung der Apoptose konnte für keine der

Versuchsgruppen eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums im Beobachtungsintervall von 14 Tagen erreicht werden. Klinisch können die niedermolekularen Heparine und auch die Acetylsalicylsäure bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen großzügig indiziert werden. Ihre antiproliferativen und antiangiogenen Eigenschaften bieten Ansatzpunkte für die Entwicklung alternativer Therapiestrategien.

## **Influence of anticoagulants on growth of extrahepatic colorectal metastases**

Colorectal carcinoma is one of the most common death-related diseases in Germany. In 2016, 58.290 people developed a colorectal carcinoma. Over the last 20 years, the prognosis has improved significantly. However, approximately 20% of the patients show already synchronous distant metastases at the time of diagnosis. The liver is the main metastatic site of colorectal carcinoma. Today, only 15-20% of the patients which have developed synchronous or metachronous metastases are feasible for curative surgical resection. So it is necessary to improve the outcome of patients with advanced metastatic colorectal cancer by developing new therapy strategies. Due to a tumor-induced hypercoagulative state, patients with colorectal carcinoma offer a high risk of venous thromboembolism. Thromboembolic complications increase morbidity and mortality. If venous thromboembolism has occurred, patients are treated with low molecular weight heparins. Previous studies postulate that the low molecular weight heparins and also acetylsalicylic acid have antitumorous properties, partly independent of their anticoagulant effects. Admittedly, the antitumorous properties are not the main target in the most of these previous studies. The anti-cancer mechanism remains unclear. The present study investigates the effects of the low molecular weight heparins enoxaparin sodium, fondaparinux and tinzaparin sodium as well as acetylsalicylic acid on tumor growth, tumor cell proliferation, angiogenesis and apoptosis of GFP-transfected CT-26.WT colorectal cancer cells in a dorsal skinfold chamber model in balb-c mice. The control group was treated with an equivalent amount of saline solution. The tumors were examined by repeated intravital microscopy on day 0, 5, 8, 11 and 14. The tumor circumference and the capillary density in the tumor periphery and in the tumor center were measured. At the end of the observation period, we also performed immunohistochemical analyses to evaluate tumor cell proliferation, angiogenesis and apoptosis. For the low molecular weight heparins fondaparinux, tinzaparin sodium as well as for the acetylsalicylic acid, we detected a significant reduction of the capillary density. Therapy with tinzaparin sodium also decreased tumor cell proliferation. Application of 85mg/kg acetylsalicylic acid significantly increased apoptosis compared with a daily application of 18 mg/kg acetylsalicylic acid. Despite the observed inhibition of cell proliferation and angiogenesis and the increase of apoptosis, we did not observe a significant inhibition of tumor growth during the observation period of 14 days for any of the experimental groups. In clinical practice, low molecular weight heparins and also acetylsalicylic acid can be generously indicated in patients with colorectal carcinoma. Their antiproliferative and antiangiogenic properties may further assist in the development of alternative therapeutic antitumor strategies.



## **2 Einleitung**

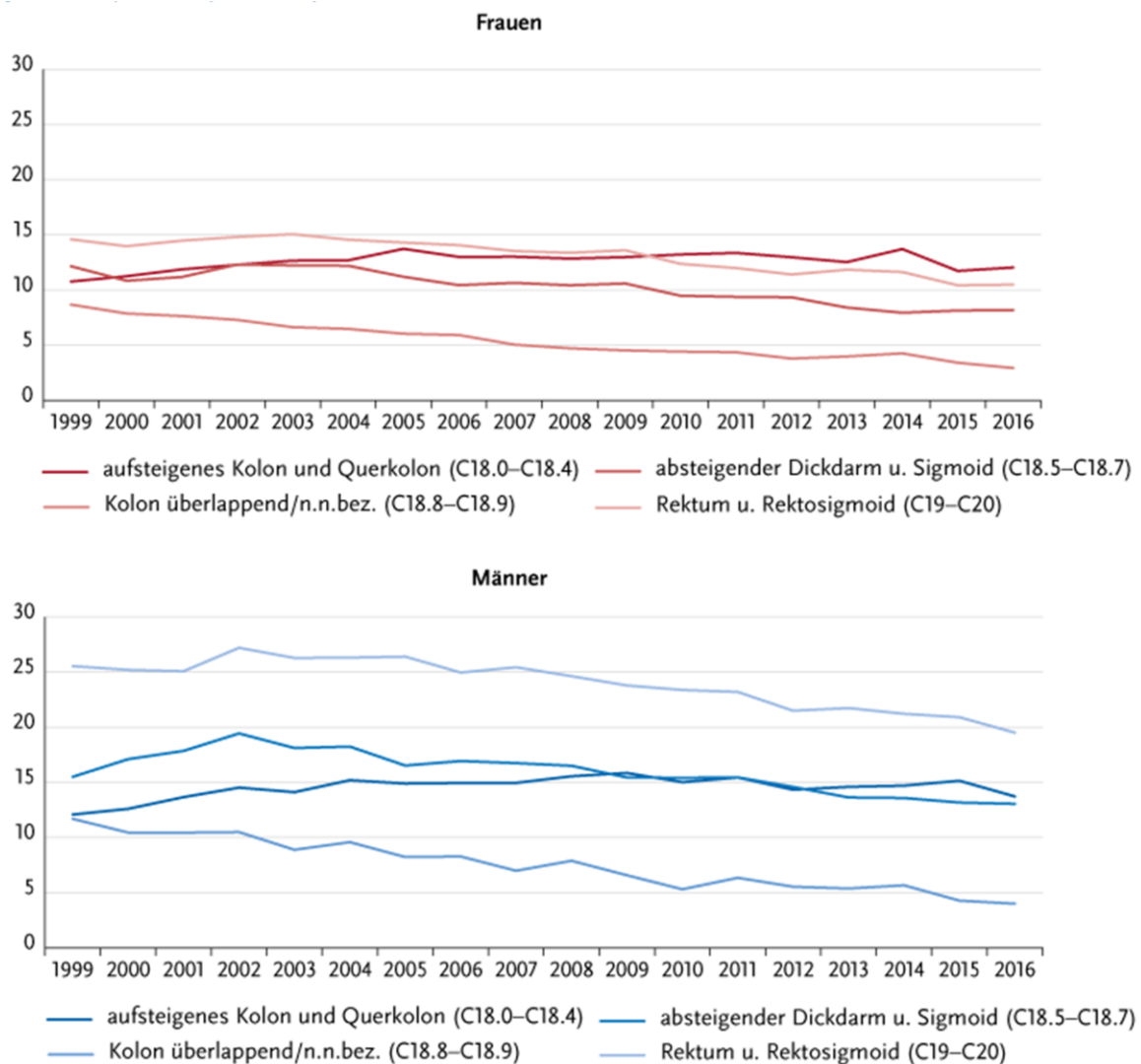
### **2.1 Das kolorektale Karzinom**

#### **2.1.1 Definition**

Unter dem Begriff des kolorektalen Karzinoms werden maligne Neoplasien des Kolons und des Rektums zusammengefasst. Als Rektumkarzinome werden nach der UICC diejenigen Karzinome des Dickdarms definiert, deren kaudaler Rand nach Messung mit dem starren Rektoskop zwischen 0 und 16 cm von der Anokutanlinie entfernt ist. Alle weiter proximal gelegenen Tumore bis hin zur Ileozökalklappe werden als Kolonkarzinome bezeichnet [S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2014].

#### **2.1.2 Epidemiologie**

Bösartige Neubildungen zählen neben den Krankheiten des Herzkreislaufsystems zu den häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland. Im Jahr 2016 wurden insgesamt 492.090 Neuerkrankungen diagnostiziert. Dabei erkrankten ca. 258.520 Männer und ca. 233.570 Frauen an Malignomen. Das kolorektale Karzinom (58.290 Erkrankte) zählt, neben den bösartigen Neubildungen der Mamma (69.660), den Prostatakarzinomen (58.780), den bösartigen Erkrankungen der Lunge sowie der Bronchien (57.460) zu den vier am häufigsten vorkommenden Krebsarten. Nach Statistiken des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahr 2016 erkrankten 58.290 Menschen an einem kolorektalen Karzinom. Das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, steigt mit zunehmendem Lebensalter an. Etwa 50% der Betroffenen erkranken nach dem 70. Lebensjahr [Brenner et al., 2014]. Die Inzidenz vor dem 55. Lebensjahr hingegen liegt nur bei 10%.



© Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut

Abbildung 1: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten von Patienten mit kolorektalen Karzinomen nach Geschlecht, Deutschland 1999– 2016, je 100.000 Einwohner (Europastandard) (Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert-Koch-Institut 2016)

Bei beiden Geschlechtern zeigt sich eine leicht rückläufige Inzidenz sowie ein Rückgang der altersstandardisierten Sterberate um mehr als 20% in den letzten 10 Jahren (Abbildung 1 (Abb.1)). Die akkumulierte 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 50% [Parau et al., 2014].

### **2.1.3 Ätiologie und Pathogenese**

Die Entstehung kolorektaler Karzinome ist ein multifaktoriell bedingter Prozess. Die sporadischen Karzinome stellen mit ca. 90% den größten Anteil dar. Die entzündlichen Darmerkrankungen (z.B. Colitis ulcerosa) und die hereditären Syndrome mit überwiegend autosomal-dominantem Erbgang wie z.B. die familiäre adenomatöse Polyposis oder die sogenannten hereditären non-polypösen kolorektalen Karzinome spielen bei der Karzinomentstehung eine eher untergeordnete Rolle [Brenner et al., 2014].

Als pathogenetische Grundlage der kolorektalen Karzinome wird eine aus der Hyperproliferation der Darmmukosa resultierende intraepitheliale Neoplasie (Adenom) verstanden, die zum größten Teil im Laufe von Monaten bis Jahren über die von Morson und Fearon et al. belegte Adenom-Karzinom-Sequenz in ein invasives Wachstum übergeht [Fearon et al., 1990, Morson, 1962]. Das Entartungsrisiko der Präkanzerosen steigt mit zunehmender Größe, dem Anteil der villösen Adenomformen und dem Grad der intraepithelialen Neoplasie [Fearon et al., 1990, Morson, 1962, Shussman et al., 2014]. Neben der für die Adenom-Karzinom-Sequenz verantwortlichen Hauptmutation im APC-Tumorsuppressorgen, den Mutationen im p53-, KRAS- und DCC-Gen sowie der chromosomalen Instabilität sind in den letzten Jahren durch die Entdeckung zusätzlicher Karzinogenesewege weitere Mutationen bedeutsam geworden. Dazu zählen die BRAF-Genmutation als Ursache der serratierten Karzinogenese mit dem sessilen serratierten Adenom als Vorläuferläsion und die Mutation im KRAS-Gen, die bei einem Mischtyp aus beiden Wegen in Form eines traditionellen serratierten Adenoms exprimiert wird [Duman-Scheel, 2012, Giannini et al., 2014, Ines et al., 2014, Lin et al., 2014, Tsai et al., 2014].

### **2.1.4 Histologische Einteilung**

Die kolorektalen Karzinome werden entsprechend histologischer Kriterien den folgenden Unterklassen zugeordnet: Adenokarzinome (ca. 85-90%), muzinöse Adenokarzinome (10%), Siegelringzellkarzinome (1%), Plattenepithelzellkarzinome, adenosquamöse Karzinome, kleinzellige Karzinome und undifferenzierte Karzinome.

### 2.1.5 Therapie des kolorektalen Karzinoms

In der Therapie des kolorektalen Karzinoms steht die Resektion des tumortragenden Darmabschnitts im Vordergrund, um auch bei bereits metastasiertem Tumorleiden die lokale Komplikationsrate zu senken. Bei kurativ therapierbaren Kolonkarzinomen erfolgt eine radikale en-bloc Resektion des tumortragenden Kolonabschnitts mit Lymphadenektomie. Das Ausmaß der Resektion ist von der Gefäßversorgung des betroffenen Darmareals abhängig. Die Methode der Wahl bei lokal begrenzten Rektumkarzinomen ist eine tiefe anteriore Rektumresektion mit partieller bzw. totaler mesorektaler Exzision. Heutzutage stellt die laparoskopische Resektion kolorektaler Karzinome bei vergleichbaren Langzeitergebnissen eine bedeutsame Alternative zur offenen Resektion dar [Jayne et al., 2010, Liang et al., 2008].

Kolonkarzinome, bei denen bereits eine lymphogene Metastasierung oder ein organüberschreitendes Wachstum vorliegt, können in kurativer Absicht im Anschluss an eine R0-Resektion adjuvant chemotherapiert werden. Beim Vorliegen einer lymphogenen Metastasierung wird beim Fehlen von Kontraindikationen eine Oxaliplatin-haltige Chemotherapie empfohlen. In der Erstlinientherapie wird eine Kombination von Oxaliplatin, Folinsäure und 5-Fluoruracil (5-FU) (FOLFOX) eingesetzt [Pox et al., 2013]. In der MOSAIC-Studie konnte für die FOLFOX-Kombinationstherapie im Vergleich zur Therapie mit Folinsäure und 5-FU eine signifikante Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens erreicht werden [Andre et al., 2004]. Liegt ein organüberschreitendes Wachstum ohne lymphogene Metastasierung vor, kann je nach Risikostratifizierung eine Fluoropyrimidin-Monotherapie erwogen werden [Gray et al., 2007]. Rektumkarzinome, die die Subserosa, das perikolische bzw. das perirektale Fettgewebe bereits infiltriert bzw. bereits lymphogen gestreut haben, sollten zur Senkung der Lokalrezidivrate einer neoadjuvanten Radiochemotherapie unterzogen werden. Es wird eine an die Radiotherapie gekoppelte 5-FU-Monotherapie mit oder ohne Folinsäure zur Verbesserung des Gesamtüberlebens empfohlen [Bosset et al., 2006, Gerard et al., 2006].

Liegen zum Diagnosezeitpunkt bereits Fernmetastasen vor, so sollten diese bei Resektabilität einer kurativen chirurgischen Therapie mit dem Ziel einer R0-Resektion unterzogen werden. Liegen jedoch primär inoperable Metastasen vor, sollte zur Verbesserung des Gesamtüberlebens eine systemische Therapie erwogen werden [Scheithauer et al., 1993]. Bei potenziell resektablen Metastasen wird eine intensiviertere systemische Therapie mit dem Ziel einer sekundären Resektabilität empfohlen. Neben 5-FU und Irinotecan (FOLFIRI-Protokoll) sowie dem FOLFOX-Protokoll [Colucci et al., 2005, Tournigand et al., 2004] findet auch eine

Kombination von Oxaliplatin und Capecitabine (XELOX-Protokoll, CAPOX-Protokoll) ihre Anwendung [Cassidy et al., 2008, Diaz-Rubio et al., 2007, Porschen et al., 2007]. Die Kombination von 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan kann im Rahmen des FOLFOXIRI-Protokolls mit dem Ziel einer Remissionsinduktion eingesetzt werden [Falcone et al., 2007, Souglakos et al., 2006]. Des Weiteren ist eine Kombinationstherapie von 5-FU/ Folinsäure sowie des XELOX und FOLFIRI-Protokolls mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab zur Erstlinientherapie zugelassen [Fuchs et al., 2007, Kabbinar et al., 2005, Saltz et al., 2008].

Als Alternative zur systemischen Therapie stehen heute bei inoperablen Lebermetastasen zudem Verfahren wie die Radiofrequenzablation (RFA) und die im Rahmen von klinischen Studien durchgeführte „Selektive Interne Radiotherapie“ (SIRT) sowie die „Laserinduzierte Interstitielle Tumorthherapie“ (LITT) zur Verfügung. Bei Vorliegen einer Peritonealkarzinose kann in Einzelfällen zudem eine „Hypertherme Intraperitoneale Chemotherapie“ (HIPEC) in Betracht gezogen werden [Pox et al., 2013].

### 2.1.6 Metastasierung

	Lymphogene Metastasierung	Hämatogene Metastasierung
<b>Kolonkarzinom</b>	paraaortale Lymphknoten	über Vena portae→Leber über Vena cava→Lunge
<b>Rektumkarzinom</b>		
<b>Oberes Drittel (12-16cm)</b>	paraaortale Lymphknoten	über Vena portae→Leber über Vena cava→Lunge
<b>Mittleres Drittel (6-&lt;12)</b>	paraaortale Lymphknoten Beckenwand	über Vena portae→Leber über Vena cava→Lunge
<b>Unteres Drittel (&lt;6cm)</b>	paraaortale Lymphknoten Beckenwand inguinale Lymphknoten	über Vena cava→Lunge

Tabelle 1: Metastasierungswege des kolorektalen Karzinoms

In der heutigen Zeit ist die Mortalität durch die Auswirkungen des Primarius dank guter chirurgischer und radio-/chemotherapeutischer Verfahren deutlich rückläufig. Für die weiterhin hohe Sterblichkeitsrate ist hauptsächlich das Auftreten von kolorektalen Fernmetastasen ursächlich. Ohne Therapie beträgt die mittlere Überlebenszeit im metastasierten Stadium 10 Monate. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt weniger als 5% [Pfannschmidt et al., 2007]. Mehr als 50% der Patienten mit primär kurativer Tumorresektion entwickeln innerhalb von 5 Jahren pulmonale und/oder hepatische Metastasen [Dudek et al., 2016, Guerrero et al., 2016]. Bei mehr als 50% der Erkrankten stellt die Metastasierung weiterhin die Haupttodesursache dar [Holzel et al., 2009]. 20% der Patienten sind bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung von synchronen Fernmetastasen betroffen [Clancy et al., 2014]. Nach einer zunächst lokalen Ausbreitung und dem Befall lokoregionärer Lymphknoten folgt in einem fortgeschrittenen Tumorstadium die hämatogene Aussaat vor allem über den Pfortaderkreis in die Leber (Tabelle 1 (Tab.1)). Tiefsitzende Rektumkarzinome können, wie in Tab. 1 beschrieben, zusätzlich über die Vena cava inferior primär pulmonal metastasieren [van Gestel et al., 2014]. Neben der Leber, als Hauptinfiltrationsgewebe, sind die Lunge, das Peritoneum, das Skelett sowie das Gehirn, die am häufigsten betroffenen Organe der Metastasierung. Ungefähr 50% der Erkrankten entwickeln während ihrer Krankheitsperiode Lebermetastasen [Konopke et al., 2003]. Nachdem Adson et al. in den 70er Jahren zeigten, dass Patienten mit resektablen Lebermetastasen kurativ therapiert werden können, hat sich die chirurgische Resektion als Goldstandard etabliert und bleibt auch in der heutigen Zeit die einzige kurative Therapieoption [Clancy et al., 2014, Simmonds et al., 2006].

Nach chirurgischer Resektion ergibt sich eine 5-Jahresüberlebensrate von 25-40% [Pox et al., 2013]. 60–70% der Patienten entwickeln jedoch nach einer primär erfolgreich durchgeführten Resektion ein Tumorrezidiv [Nordlinger et al., 2013, Scheele et al., 1990]. Bei Diagnosestellung sind allerdings nur ca. 10-20 % der Lebermetastasen primär resektabel [Clancy et al., 2014, de Jong et al., 2011, Mitry et al., 2008]. Auch beim Vorliegen von pulmonalen Metastasen bleibt eine chirurgische Resektion wie bereits 1965 von Thomford et al. beschrieben die einzige kurative Therapieoption [Thomford et al., 1965]. Die 5-Jahresüberlebensraten nach primärer Resektion liegen zwischen 32 und 50% [Lee et al., 2007, Pfannschmidt et al., 2003]. Das Rezidivrisiko beträgt weiterhin bis zu 68% [Guerrero et al., 2016]. Für Patienten, die im Rahmen eines pulmonalen Metastasenrezidivs einer erneuten Resektion unterzogen wurden, beträgt die 5-Jahresüberlebensrate 50% [Guerrero et al., 2016]. Allerdings ist nur bei einem geringen Anteil der betroffenen Patienten eine Resektion möglich. Bei 5-10% der Patienten liegt bereits zum Diagnosezeitpunkt eine peritoneale Metastasierung vor, ca. 20-50% sind im Verlauf von metachronen peritonealen Metastasen

betroffen. Trotz systemischer Therapie und palliativer Chirurgie beträgt die mittlere Überlebenszeit nur weniger als 6 Monate [Cao et al., 2009, Verwaal et al., 2008].

Da auch heute nur 15-20% der synchronen und metachronen Fernmetastasen in kurativer Absicht reseziert werden können [Pox et al., 2013], stellen inoperable Metastasen weiterhin ein bedeutsames Problem kurativer Therapiestrategien dar, sodass die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Verbesserung des Outcomes von kolorektalen Karzinompatienten immer noch notwendig ist.

## **2.2 Kolorektale Karzinome und Thromboserisiko**

Patienten mit Malignomen weisen ein insgesamt 7-fach erhöhtes Risiko für venöse Thrombembolien auf. Thrombotische Komplikationen treten gehäuft bei Patienten mit mucinbildenden Adenokarzinomen, hämatologischen Malignomen und Gehirntumoren auf. Das vermehrte Auftreten von Thrombosen bis hin zum arteriellen Verschluss bedingen eine erhöhte Morbidität und Mortalität der Patienten [Mousa et al., 2009, Prandoni et al., 2005]. Ursächlich für die Thromboseneigung sind neben der Grunderkrankung, die Immobilisierung der Patienten, die chirurgische und systemische Therapie sowie das Auftreten Karzinom-assoziiertes paraneoplastischer Syndrome. Die enge Verbindung zwischen Karzinomerkrankung und Thrombose wurde erstmals 1865 von dem Franzosen Armand Trousseau beschrieben, der die venöse Thrombophlebitis als Zeichen einer viszeralen Tumorerkrankung beschrieb [Kawai et al., 2014, Trousseau et al., 1867]. Bei ca. 10% der Patienten mit idiopathischen Thrombosen werden nach ausgiebiger Diagnostik im Verlauf Karzinome diagnostiziert [Prandoni et al., 2005]. Das Risiko thrombembolischer Komplikationen steigt mit zunehmendem Tumorstadium [Alcalay et al., 2006, Blom et al., 2005]. Alcalay et al. zeigten zudem, dass das Auftreten thrombembolischer Ereignisse im nicht metastasierten Tumorstadium zu einer 1,5-1,8fach erhöhten Mortalität führt [Alcalay et al., 2006]. Zur Prophylaxe und Therapie venöser Thrombembolien werden heutzutage orale Antikoagulanzen, unfraktionierte Heparine (UFH) und niedermolekulare Heparine (NMH) eingesetzt. Eine tägliche Applikation von NMH zeigte in Studien im Vergleich zur Placebogruppe einen Überlebensvorteil [Kakkar et al., 2004].

Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, ob diese Reduktion der Mortalität nur durch die Reduktion thrombembolischer Komplikationen bedingt ist oder aber ob die NMH antitumoröse

Eigenschaften besitzen und so eine Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiestrategien bilden könnten.

### **2.3 Tumorwachstum und Angiogenese**

Neben proliferativen Stimuli benötigen Tumorzellen und Mikrometastasen zur Differenzierung zu klinisch relevanten Malignomen eine suffiziente Gefäßversorgung. Dieser Vorgang, bei dem aus bereits bestehenden Gefäßen neue tumoreigene Gefäße entstehen, bezeichnet man als Tumorangiogenese. Folkman postulierte Anfang der 70er Jahre, dass ab einer Tumorgröße von zwei bis drei Millimetern die Ausbildung eines eigenen Gefäßnetzes notwendig wird, um eine ausreichende Nährstoffzufuhr zu gewährleisten [Folkman, 1971]. Im gesunden Organismus wird eine Homöostase zwischen antiangiogenen und proangiogenen Mechanismen aufrechterhalten. Eine mangelhafte Nährstoffversorgung und die Akkumulation von Stoffwechselprodukten verhindert bei einer Vielzahl von Tumoren die Ausdifferenzierung zu bedrohlichen Prozessen. Diese Neoplasien bleiben teils lebenslang inapparent, können aber durch ein plötzliches Überwiegen pro-angiogener Stimuli zu gefährlichen Neubildungen heranwachsen [Bergers et al., 2003]. Dieser kritische Schritt des „Angiogenic Switch“ wird durch ein Absinken der Sauerstoffkonzentration sowie der damit verbundenen Ausschüttung des Hypoxie induzierten Faktors (HIF) [Bouck et al., 1996, Maxwell et al., 2001] und der anschließenden Induktion weiterer Neoangiogenese fördernder Stimuli und Faktoren ausgelöst. Dazu zählen Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Angiogenin sowie Chemokin Interleukin 8 (IL-8) [Bouck et al., 1996]. Angiostatin, Platelet Factor 4 (PF-4) sowie Interleukin 12 (IL-12) sind natürliche Hemmer der Gefäßneubildung. Die Entdeckung der Angiogenese-kontrollierenden Faktoren eröffnet vielversprechende antiangiogene Therapieoptionen und bietet Ansatzpunkte für eine weiterführende Forschung.

VEGF- und Epidermal Growth Factor (EGF)-hemmende Substanzen finden bereits standardmäßig Einsatz in der Therapie von kolorektalen Karzinomen [Pox et al., 2013].

### **2.4 Hämostase und Thrombose**

Die Hämostase oder Blutgerinnung wird unterteilt in eine primäre und sekundäre Hämostase. Die primäre oder zelluläre Hämostase beinhaltet die Thrombozytenadhäsion an geschädigtem



Endothel über den Von-Willebrand-Faktor (vWF) und den Glykoprotein Ib (GPIb)-Rezeptor. Außerdem impliziert sie die Thrombozytenaktivierung, die Thrombozytenaggregation über GPIIb/IIIa-Rezeptoren sowie Fibrinogen und somit die Bildung eines weißen Thrombus. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zur Freisetzung von Thromboxan (TX) und Plättchenaktivierendem Faktor (PAF). Die sekundäre Hämostase unterteilt sich in einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg. Im Rahmen von Gewebsverletzungen kommt es zur Komplexbildung zwischen dem Tissue Factor (TF) und dem Faktor VIIa (FVIIa) und dessen Aktivierung. Dieser TF/FVIIa-Komplex führt dann zur Aktivierung des FXa. Der aktivierte FXa und der aktivierte Gerinnungsfaktor Va bilden dann einen Komplex, der Prothrombin zu Thrombin spaltet. Diese Thrombinaktivierung führt zur Stimulation des intrinsischen Weges. Hierbei kommt es durch Aktivierung einer Vielzahl von Gerinnungsfaktoren (FXIa, FIXa, FVIIIa) schließlich zur Einleitung der gemeinsamen Endstrecke und zur vermehrten Bildung von Thrombin. Dieses spaltet schließlich Fibrinogen in Fibrinmonomere, die zusammen mit den aktivierten Thrombozyten und dem aktivierten FXIIIa einen roten Thrombus bilden. Im Rahmen der natürlichen Hämostase gibt es ein Gleichgewicht zwischen aktivierenden und hemmenden Faktoren der Blutgerinnung. Als hemmende Faktoren spielen vor allem der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), das Protein S, das Protein C und Antithrombin eine bedeutsame Rolle. Antithrombin baut Thrombin und die aktivierten Gerinnungsfaktoren FIXa und FXa ab und aktiviert den Tissue-Type Plasminogen Activator (t-PA), der über eine Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin zum Abbau der Fibrinmonomere führt [Versteeg et al., 2013]. Kommt es durch ein Ungleichgewicht zwischen Gerinnungsaktivierung und Gerinnungshemmung zu einem Überwiegen der Gerinnungsaktivatoren, wird die Entstehung venöser Thromben begünstigt.

## **2.5 Heparine**

Heparine sind Mucopolysaccharide, die die Blutgerinnung hemmen und neben einem sulfatierten D-Glucosamin aus einer D-Gluconsäure bestehen. Man unterscheidet UFH mit einer Größe von ca. 12kDa und fraktioniertes NMH. Die in unserer Studie angewandten Substanzen Enoxaparin-Natrium, Fondaparinux und Tinzaparin-Natrium zählen zur Gruppe der NMH. Sie werden fächerübergreifend in der Therapie und Prophylaxe venöser Thrombosen und Thrombembolien eingesetzt. Die NMH sind Spaltprodukte des UFH und haben im Mittel eine Größe von 4,5kDa. Das UFH bindet an Antithrombin III (AT-III) und beschleunigt durch Konformationsänderung die AT-III-vermittelte Thrombinhemmung. NMH

führen aufgrund der geringeren Molekülgröße zu einer selektiveren Blockade der Gerinnungsfaktoren als UFH [Graefe et al., 2011].

Enoxaparin-Natrium ist ein NMH und wird durch alkalische Depolymerisation aus Heparin-Benzylestern gewonnen, die aus der intestinalen Mukosa von Schweinen isoliert werden. Die Molekülgröße beträgt 4,5kDa. Enoxaparin-Natrium bewirkt über eine Aktivierung von AT-III die Inhibition von Gerinnungsfaktoren und führt zur Freisetzung des TFPI sowie zu einer verminderten Freisetzung des vWF aus dem Gefäßendothel.

Das synthetisch hergestellte Fondaparinux hingegen führt über eine Aktivierung von AT-III zu einer selektiven Faktor-Xa-Hemmung [Da Pozzo et al., 2012]. Es zählt mit einer Molekülgröße von 1,728kDa zu den „ultra-low-molecular-weight heparins“.

Tinzaparin-Natrium ist ebenfalls ein NMH, das durch enzymatische Depolymerisation aus UFH aus der Mukosa des Schweinedarmes gewonnen wird. Die Molekülgröße beträgt 6,5kDa. Es führt über eine Aktivierung von AT-III zu einer selektiven Hemmung des aktivierten FXa [Mousa et al., 2009].

Gemessen wird die antikoagulative Potenz dieser Substanzen über eine Bestimmung der Anti-Xa-Aktivität im Blut der Patienten.

## **2.6 Die Bedeutung der Heparine in der Tumorthherapie**

Wie bereits unter 2.2 aufgezeigt, weisen Malignompatienten ein deutlich erhöhtes Risiko für venöse Thrombembolien auf. Zur Prophylaxe werden die Patienten mit Cumarinen, Heparinen bzw. NMH versorgt [Gray et al., 2008, Mousa et al., 2009, Siragusa et al., 1996]. Siragusa et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Therapie mit NMH der Therapie mit UFH in der Prophylaxe venöser Thromboembolien überlegen ist. In einer Subgruppe der Patienten mit malignen Erkrankungen konnte durch die Applikation von NMH eine niedrigere Mortalitätsrate im Vergleich zu UFH aufgezeigt werden [Siragusa et al., 1996]. Dieses Ergebnis lässt neben der Prophylaxe venöser Thromboembolien zusätzlich eine Wirkung der NMH auf das Fortschreiten einer Karzinomkrankung vermuten. Diese These bestätigten Kakkar et al. mit einer Studie über die Auswirkung von Dalteparin-Natrium auf Mamma-, kolorektale, Pankreas- und Ovarialkarzinome. Sie zeigten, dass eine Therapie mit Dalteparin-Natrium nach einer Beobachtungszeit von 2 und 3 Jahren einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur Placebogruppe bietet [Kakkar et al., 2004].

Klerk et al. bestätigten diese Ergebnisse 2005 und belegten, dass das NMH Nadroparin die Mortalität von Patienten mit soliden Tumoren senkt und die mittlere Überlebenszeit verlängern kann. Sie zeigten in ihrer MALT-Trial für 302 Patienten ohne thrombembolische Ereignisse einen Überlebensvorteil von 2 Monaten durch die Therapie mit Nadroparin [Klerk et al., 2005].

Die Erklärungsansätze zur Wirkung der NMH sind in der Literatur vielfach diskutiert.

Hauptverantwortlich für die erhöhte Thromboseneigung der Patienten ist ein Karzinombedingtes hyperkoagulatives Stadium [Prandoni et al., 2005]. Dieses hyperkoagulative Stadium wird durch die Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen, prokoagulatorischen Faktoren und durch eine direkte Interaktion der Tumorzellen mit dem Endothel verursacht [Mousa et al., 2009, Prandoni et al., 2005]. Hierbei kommt es vor allem zu einer vermehrten Ausschüttung des TF sowie des Cancer Procoagulant (CP) [Mousa et al., 2009, Prandoni et al., 2005, Rickles et al., 2001].

Der TF führt über eine Komplexbildung mit dem FVII zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und zur Aufrechterhaltung des hyperkoagulativen Stadiums. Zudem aktiviert der TF durch Stimulation der Protease-activated Rezeptors (PAR) die Tumorangiogenese und das Tumorstadium durch Ausschüttung von VEGF und IL-8 [Tieken et al., 2016].

Es wird postuliert, dass die NMH in einem gerinnungsabhängigen Signalweg über eine Aktivierung der Ausschüttung des TFPI zu einer Hemmung der TF-vermittelten Tumorstadiums führen können [Mousa et al., 2004].

Neben diesem gerinnungsabhängigen Weg wird zusätzlich ein gerinnungsunabhängiger Weg für die antitumoröse Wirkung der NMH verantwortlich gemacht. Alyahya et. al konnten in ihrer Studie auch für non-anticoagulant Heparine eine antiproliferative Wirkung nachweisen [Alyahya et al., 2015]. Es wird vermutet, dass die NMH durch Hemmung der Selektinvermittelten Extravasation von Tumorzellen die Metastasierung hemmen. Selektine sind Oberflächenrezeptoren, die auf Endothelzellen, Leukozyten, Thrombozyten und auch auf malignen Zellen exprimiert werden. P- und L-Selektine rufen eine Aggregation dieser Zellen hervor und legen den Grundstein für eine Extravasation von Leukozyten und Tumorzellen. Zudem führt das P-Selektin über eine Thrombozytenaktivierung und eine direkte Interaktion mit Monozyten zu einer Stimulation des TF-Pathways. Die Wirkung der NMH auf diesen gerinnungsunabhängigen Signalweg wird vor allem durch eine direkte Hemmung der P-Selektine vermittelt. Durch eine Hemmung der Zellaggregation wird die Tumorzelle zudem für die körpereigene Immunabwehr angreifbarer [Borsig et al., 2001, Garcia et al., 2007, Mousa et al., 2009, Stevenson et al., 2005, Wei et al., 2004].

Als weitere Wirkung der NMH wird eine Hemmung der Heparanase postuliert. Die Heparanase ist ein Enzym, das Heparansulfatseitenketten der Zelloberflächen und der extrazellulären Matrix spalten kann. Tumorzellen, wie beispielsweise Kolonkarzinomzellen, zeichnen sich durch eine Überexpression der Heparanase aus. Der Heparanase wird eine fördernde Wirkung auf die Metastasierung, eine Gerinnungsaktivierung und eine Stimulation der Angiogenese durch Aktivierung des an die Heparansulfate gebundenen VEGF zugesprochen. Zusätzlich führt eine Überexpression der Heparanase zu einer verstärkten TF-Ausschüttung und durch eine Komplexbildung mit dem TFPI zu dessen Inaktivierung [Mousa et al., 2009, Nadir et al., 2014, Vlodaysky et al., 2006, Vlodaysky et al., 2007].

## **2.7 Acetylsalicylsäure**

Die Acetylsalicylsäure gehört zur Gruppe der sauren nicht-steroidalen Antirheumatika und ist ein Hemmer der Cyclooxygenasen. Sie hemmt irreversibel die Aktivität der Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2). Über eine Hemmung der konstitutiv exprimierten COX-1 führt die Acetylsalicylsäure vor allem zu einer Hemmung der Thromboxan A<sub>2</sub> (TX-A<sub>2</sub>)-Synthese in den Thrombozyten und wirkt dadurch inhibierend auf die Thrombozytenaggregation sowie die Thrombozytenaktivierung. In den Epithelzellen des Magens übt die COX-1 durch die Produktion von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PG-E<sub>2</sub>) einen zytoprotektiven Effekt aus. Die COX-2 ist vor allem im Gehirn, in der Niere, im Knochen und in Gefäßen lokalisiert. Sie ist im Gegensatz zur COX-1 ein induzierbares Enzym, das im Rahmen eines Entzündungsgeschehens überexprimiert wird. Ihre Hemmung hat eine verminderte Prostaglandinbildung zur Folge. Prostaglandine wie beispielweise das PG-E<sub>2</sub> sind Gewebshormone, die antiphlogistische, antiinflammatorische und antipyretische Eigenschaften aufweisen [Graefe et al., 2011].

## **2.8 Die Bedeutung der Acetylsalicylsäure in der Tumorthherapie**

Die Acetylsalicylsäure wird vor allem in der Therapie und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt. So ist eher zufällig aufgefallen, dass Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt sind und gleichzeitig Acetylsalicylsäure eingenommen haben, einen Überlebensvorteil zeigten. Flossmann et al. zeigten 2007 in einer randomisierten Studie mit Daten der British Doctor Aspirin Trial sowie der UK-TIA Aspirin-Trial, dass die Inzidenz

eines kolorektalen Karzinoms in einem Zeitraum von 20 Jahren durch Einnahme von high-dose Acetylsalicylsäure um über 30% gesenkt werden konnte. Eine Übersichtsarbeit von Rothwell et al. schloss 2010 neben den bereits genannten Studien zusätzlich die Thrombosis Prevention Trial, die Swedish Aspirin Low Dose Trial und die Dutch TIA Trial ein. Sie zeigte, dass die Reduktion des Risikos, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, von der Dauer der Einnahme abhängt. Bei einer mittleren Einnahmezeit von 5,8 Jahren konnte gezeigt werden, dass das Langzeitrisiko, an einem Kolonkarzinom zu erkranken, unter der Einnahme von mindestens 75mg Acetylsalicylsäure am Tag geringer ist. Ein Benefit höherer Dosen konnte nicht ermittelt werden. Dabei zeigte sich vor allem ein Einfluss auf proximale Kolonkarzinome [Rothwell et al., 2010, Sostres et al., 2014]. Zwischen den proximalen und distalen Karzinomen ergab sich ein signifikanter Unterschied bezüglich Inzidenz und Mortalität [Rothwell et al., 2010]. Zudem zeigten Rothwell et al., dass die Acetylsalicylsäure-Einnahme einen stärkeren Einfluss auf die Mortalität ausübt als auf die Inzidenz. Studien von Baron et al. und Benamouzing et al. zeigten auch einen protektiven Effekt der Acetylsalicylsäure auf die Bildung neuer Adenome nach Polypektomie [Baron et al., 2003, Benamouzig et al., 2003].

Dem gegenüber steht beispielsweise die Physician's Health Study und die Womens Health Study, die keinen positiven Effekt der Acetylsalicylsäure auf kolorektale Karzinome zeigten. Die Ergebnisse sind kritisch zu diskutieren, da es sich bei den genannten Analysen um rein sekundäre Analysen handelt, deren Daten ursprünglich zur Evaluation des Effekts der Acetylsalicylsäure auf kardiovaskuläre Ereignisse gedacht waren [Sostres et al., 2014].

Rothwell et al. zeigten in einer ihrer Arbeiten, dass die Einnahme von Acetylsalicylsäure nach Diagnose eines kolorektalen Karzinoms einer Metastasenentstehung vorbeugt [Rothwell et al., 2012]. Eine Studie von Cardwell et al. hingegen konnte bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen keinen Überlebensvorteil durch eine Acetylsalicylsäureeinnahme nach Diagnosestellung nachweisen [Cardwell et al., 2014].

Die Wirkung der Acetylsalicylsäure auf kolorektale Karzinome wird auf eine Hemmung der Cyclooxygenasen zurückgeführt (siehe 2.7). Die COX-2 wird bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen nicht nur im Endothel, sondern auch im Tumorgewebe exprimiert [Harper et al., 2008, Sostres et al., 2014]. In fast 50% der kolorektalen Adenome und in ca. 80-90% der kolorektalen Karzinome kann eine gesteigerte COX-2 Expression nachgewiesen werden [Sostres et al., 2014]. Die COX-2 produziert in Tumorzellen vor allem PG-E<sub>2</sub>, das sowohl die Apoptose hemmt, als auch die Angiogenese und das Tumorstadium fördert [Sheng et al., 1998, Sostres et al., 2014]. Für die COX-2 Überexpression wird neben einem Defekt des APC-Tumorsuppressorgens auch eine Expressionsinduktion durch die Thrombozyten

verantwortlich gemacht. Dies konnte in einem Mausmodell bestätigt werden [Guillem-Llobat et al., 2016, Oshima et al., 1996, Sheng et al., 1998, Williams et al., 1996]. Die Wirkung der Acetylsalicylsäure auf kolorektale Karzinome wird vor allem bei Karzinomen mit erhöhter COX-2 Expression beobachtet. Dies bestätigt die Hypothese einer COX-vermittelten Wirkung der Acetylsalicylsäure [Chan et al., 2007, Pox et al., 2008, Sheng et al., 1998]. Sample et al. konnten in ihrer Studie für eine 4-wöchige Acetylsalicylsäure Einnahme einen signifikanten Abfall der PG-E2 Konzentration in der Kolonmukosa nachweisen [Sample et al., 2002].

Neben einer COX-2-vermittelten Tumorstimulation wird zudem auch eine Aktivierung des Tumorwachstums durch die COX-1 sowie durch TX-A2 vermutet. Diese Vermutung bestärkt eine Arbeit von Pradono et al., die einen steigernden Einfluss von TX-A2 auf das Tumorzellwachstum, die Angiogenese und die Metastasierung von Tumoren nachweisen konnten [Matsui et al., 2012, Nie et al., 2000, Pradono et al., 2002].

Neben der COX-abhängigen Wirkung der Acetylsalicylsäure wird zusätzlich auch eine COX-unabhängige Wirkung der Acetylsalicylsäure auf die Angiogenese sowie die Zellproliferation und das Tumorwachstum von Kolonkarzinomen postuliert [Dai et al., 2017, Din et al., 2012, Mitrugno et al., 2017].

## 2.9 Ziele der Studie

- Bewirkt eine 14-tägige Applikation der NMH Enoxaparin-Natrium, Tinzaparin-Natrium und Fondaparinux eine Reduktion der Tumorzellproliferation und eine Erhöhung der Tumorzellapoptose in extrahepatischen kolorektalen Metastasen im Rückenhautkammermodell der Maus?
- Bewirkt eine 14-tägige Applikation der NMH Enoxaparin-Natrium, Tinzaparin-Natrium und Fondaparinux eine Inhibition der Tumorangiogenese in extrahepatischen kolorektalen Metastasen?
- Kann durch eine höhere Dosierung der NMH Enoxaparin-Natrium, Tinzaparin-Natrium und Fondaparinux im Vergleich zur niedrigeren Dosierung eine verstärkte Wirkung erzielt werden?
- Bewirkt eine 14-tägige Applikation der NMH Enoxaparin-Natrium, Tinzaparin-Natrium und Fondaparinux eine Reduktion des Tumorwachstums?
- Bewirkt eine 14-tägige Applikation von Acetylsalicylsäure eine Reduktion der Tumorzellproliferation und eine Erhöhung der Tumorzellapoptose in extrahepatischen kolorektalen Metastasen im Rückenhautkammermodell der Maus?
- Bewirkt eine 14-tägige Applikation von Acetylsalicylsäure eine Inhibition der Tumorangiogenese in extrahepatischen kolorektalen Metastasen?
- Kann durch eine höhere Dosierung der Acetylsalicylsäure im Vergleich zur niedrigeren Dosierung eine verstärkte Wirkung erzielt werden?
- Bewirkt eine 14-tägige Applikation von Acetylsalicylsäure eine Reduktion des Tumorwachstums?

### **3 Material und Methodik**

#### **3.1 Zellbiologische Methoden**

##### **3.1.1 Tumorzelllinie**

Für das vorliegende Versuchsmodell wurden GFP-transfizierte Tumorzellen der Maus-Kolonkarzinomzelllinie CT26.WT (ATCC CRL-2638, LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland) verwendet. Die Zellen stammen von einem N-Nitroso-N-Methylurethan-induzierten, undifferenzierten Adenokarzinom des Kolons und werden zur syngenen Transplantation in die Balb/c Maus eingesetzt.

Die Zellen wurden als Monolayer in RPMI-1640 Medium mit 2mM L-Glutamin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 10% FCS (Fetal calf serum, FCS-Gold, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories GmbH) kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einer feucht-warmen Atmosphäre bei 37°C mit 5%igem Kohlendioxidgehalt.

Um eine mehrmalige retrobulbäre Farbstoffinjektion im Versuchsablauf zu vermeiden, wurden Tumorzellen ausgewählt, die zuvor transfiziert wurden und somit das Green Fluorescent Protein (GFP) exprimieren. Die daraus resultierende Eigenfluoreszenz der GFP-CT26.WT Zellen ermöglicht die repetitive Beurteilung von Tumorwachstum und Tumorzellausdehnung in der Rückenhautkammer.

##### **3.1.2 Kultivierung und Vermehrung**

Eine Passagierung der GFP-transfizierten CT26.WT Zellen wird durchgeführt, wenn eine 70-80%ige Oberflächenbedeckung (Konfluenz) im Kulturgefäß vorliegt. Der Zellrasen wurde zunächst enzymatisch mit Trypsin/EDTA (0,05%/0,2%, PAA Laboratories GmbH) von der Gefäßoberfläche gelöst. Nach erfolgter Neutralisation mit FCS-haltigem Medium wurde die Zellsuspension für 5min bei 1600U/min bzw. 400xg (Hettich, Universal 30 F, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die weiterführende Kultivierung erforderte eine Ausdünnung im Verhältnis 1:5.



### **3.1.3 Herstellung der Zellpellets**

Nach oben beschriebenem Vorgehen wurden die Tumorzellen am Tag der Implantation aus den Kulturgefäßen gelöst und nach Neutralisierung des Enzyms und Waschen der Zellen mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für je 3min bei 1600U/min bzw. 400xg (Hettich Universal 30F) zentrifugiert. Danach wurde das resuspendierte Zellpellet in ein Eppendorf-Gefäß überführt und noch 2x 5min bei 5000U/min bzw. 2500xg (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland) zentrifugiert. Nach Entfernung des gesamten Überstandes war das Zellpellet bereit für die Transplantation in die Rückenhautkammer.

## **3.2 Tierexperimentelles Versuchsvorhaben**

### **3.2.1 Versuchstiere**

Die beschriebenen Experimente wurden nach §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes durch die Tierschutzbehörde des Landesamtes für Soziales und Verbraucherschutz genehmigt. Verwendet wurden 64 20-25g schwere, weibliche Balb/c Mäuse (Charles River Labor GmbH, Sulzfeld, Deutschland), die in Einzelkäfigen bei einer Raumtemperatur von 22-24°C und einer relativen Luftfeuchte von 60-65% gehalten wurden. Den Tieren war es möglich sich frei zu bewegen und je nach Bedarf Trinkwasser und Standard-Labornahrung (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) zu sich zu nehmen. Ein 12-stündiger Tag-Nacht Rhythmus wurde stets aufrechterhalten. Täglich wurden Allgemeinzustand, Fress- und Trinkverhalten kontrolliert und begutachtet.

### **3.2.2 Das Modell der Rückenhautkammer**

Eine Miniaturisierung der ursprünglich beim Hamster angewendeten Rückenhautkammer [Laschke et al., 2011, Lehr et al., 1993, Menger et al., 2002] ermöglicht uns heute eine bei Mäusen erfolgreich durchführbare Implantation von Zellen, Geweben und Biomaterialien mit geringem chirurgischem Trauma. Das dabei freipräparierte Gewebe um den Musculus panniculus carnosus dient als Basis für das Wachstum von Zellpräparaten, Gewebetransplantaten sowie Biomaterialien und für die Ausbildung eines neuen Gefäßnetzes.

Die Neovaskularisation spielt vor allem auf dem Gebiet der Tumorforschung eine bedeutsame Rolle. Hierbei interessieren im Besonderen die zur Angiogenese führenden Mechanismen. Eine suffiziente Blutversorgung des Tumors bildet die Grundlage für Wachstum und Metastasierung [Folkman, 1990]. Die Intravitalmikroskopie (IVM) ermöglicht nach erfolgreicher Implantation eine wiederholte nicht invasive, mehrtägige bis zu zweiwöchige Beurteilung und Dokumentation von Tumorwachstum und Vaskularisierung an der narkotisierten Maus sowie eine spätere Quantifizierung von Messparametern mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogrammes (Cap Image, Version 6.02, Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) [Laschke et al., 2011, Menger et al., 2002].

Die Rückenhautkammer besteht aus zwei spiegelbildlich konstruierten Titanrahmen, die durch Schrauben aneinander befestigt werden (s. Abb. 2). In der Mitte des Titanrahmens befindet sich jeweils ein für die Intravitalmikroskopie erforderliches Beobachtungsfenster. Dieses lässt sich im Bereich der freipräparierten Rückenmuskulatur mit einem Deckglas luftdicht verschließen. Ein darauf platzierbarer Sprengring ermöglicht eine sichere Fixation. Entlang des oberen Titanrahmenrandes befinden sich mehrere Bohrungen zur Befestigung der Rückenhaut mittels Fixationsfäden am Kammerrahmen.

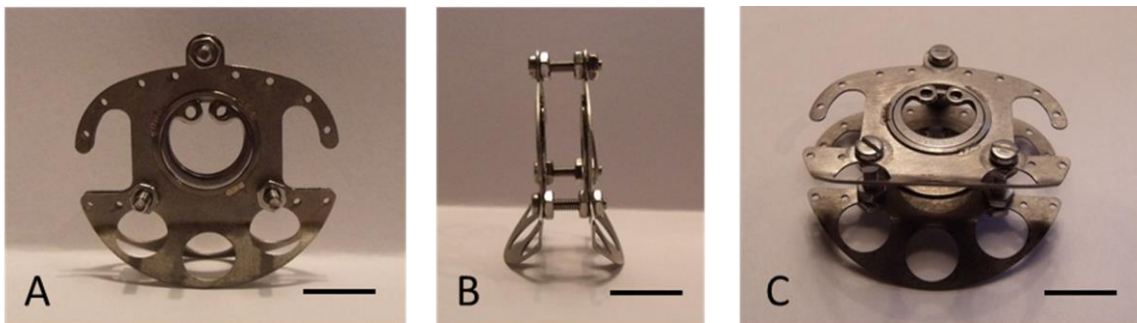


Abbildung 2: A,B,C: Rückenhautkammer, Maßstab= 10mm

### 3.2.3 Narkose

Vor Einleitung der im Versuchsablauf sechsmalig durchgeführten Narkose wurde zunächst das Körpergewicht jedes einzelnen Tieres mittels einer Waage erfasst.

Die zu Beginn einer Versuchsreihe frisch hergestellte Narkoselösung setzte sich wie folgt zusammen:

- 0,75ml Ketavet® (1ml=120mg Ketaminhydrochlorid, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland)
- 1ml Rompun® 2% (1ml= 20mg Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland)
- 8,25ml 0,9% isotone Natriumchloridlösung (Braun, Melsungen, Deutschland)

Die Mäuse erhielten anschließend 0,1ml + 10% pro 10g Körpergewicht der zuvor hergestellten Narkoselösung. Somit war es möglich, die Tiere für die Dauer der Präparation der Rückenhautkammer, der Tumorimplantation sowie der Durchführung der IVM in eine tiefe Narkose zu überführen.

### **3.2.4 Präparation der Rückenhautkammer**

Zunächst ist es notwendig, den hinteren Titanrahmen der Rückenhautkammer mit 3 Halteschrauben zu versehen und diese mit entsprechenden Muttern zu fixieren. Vor der Präparation wird die Kammer samt Instrumentarium im Ultraschallbad gereinigt. Die Titanrahmen werden danach in eine Desinfektionslösung überführt.

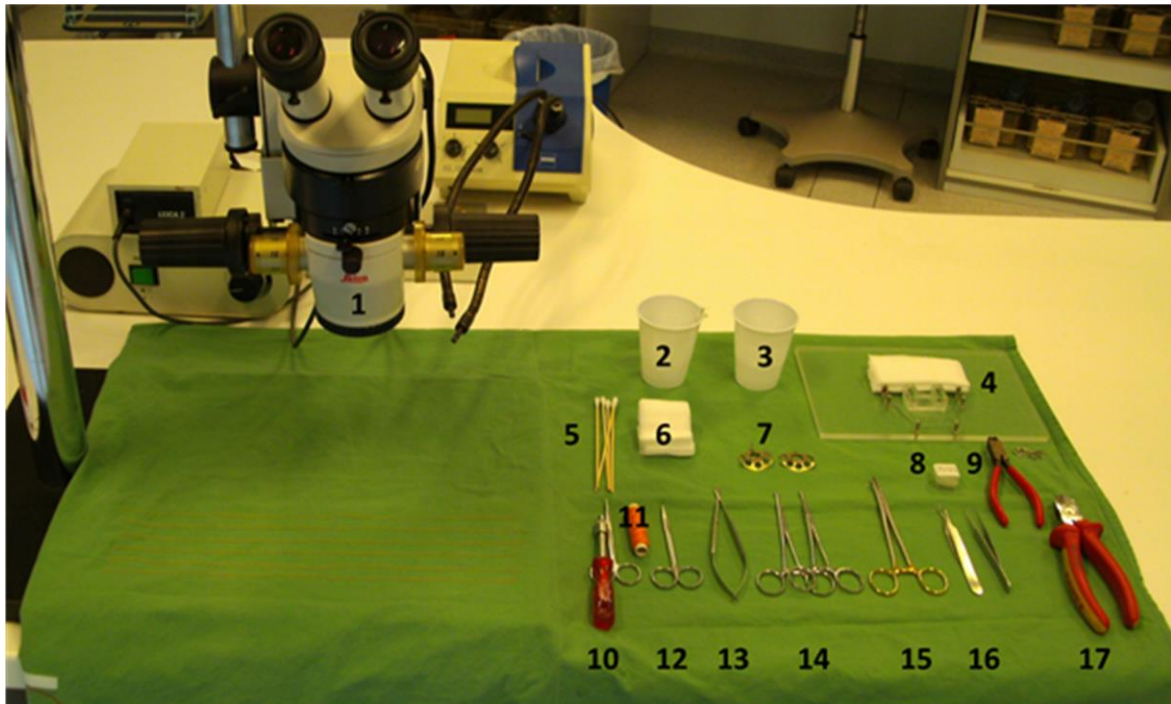


Abbildung 3: Arbeitsplatzübersicht

1 Operationsmikroskop, 2 Natriumchlorid, 3 Desinfektionslösung, 4 OP-Tisch, 5 Stieltupfer, 6 Kompressen, 7 Rückenhautkammer, 8 Deckgläser, 9 Sprengringklemme, 10 Schraubenzieher, 11 Nähgarn, 12 Scheren, 13 Mikroschere, 14 Klemmen, 15 Nadelhalter, 16 Mikropinzetten, 17 Zange

Anschließend wird die Maus anhand des unter Punkt 3.2.3 aufgeführten Narkoseschemas durch eine intraperitoneale Injektion anästhesiert. Zum Schutz der Augen vor dem Austrocknen wird eine Augensalbe aufgetragen (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland).

Nach Ausbleiben einer Reaktion auf den mit einer spitzen Pinzette auslösbaren intradigitalen Schmerzreiz, dem sogenannten Zwischensehnenreflex, kann das Tier auf die Operation vorbereitet werden. Erforderlich für die spätere Präparation ist eine unversehrte, haarlose Haut im kammertragenden Areal des Rückens der Maus, wie in Abb. 4A zu sehen ist. Zunächst wird mit einem Elektrorasierer (Isis, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) der größte Teil des dichten Fells entfernt. Um eine vollständige Haarentfernung zu erreichen, wird für ein paar Minuten eine Haarentfernungscreme (Plica med®, ASID BONZ GmbH, Böblingen, Deutschland) aufgetragen. Der Rücken wird hiernach mit lauwarmem Wasser gereinigt und mit einem Tuch sorgfältig abgetrocknet, um einen Abfall der Körperkerntemperatur der Maus zu verhindern.

Nach vollständiger Depilation wird der kammertragende Bereich zunächst gründlich desinfiziert (Softasept®, Braun, Melsungen, Deutschland). Das Versuchstier wird nun in

Bauchlage überführt. Danach wird die leicht verschiebbare Rückenhautfalte unter Gegenlichtkontrolle entlang der Medianlinie angehoben und durch einen kranialen und einen kaudalen Haltefaden aus gewöhnlichem Nähgarn an einer Haltevorrichtung aufgespannt (s. Abb. 4B). Dabei ist darauf zu achten, dass das Tier von unten durch eine dicke Lage aus herkömmlichen Kompressen gestützt und entlastet wird. Im Anschluss kann mit der Anbringung des hinteren Titanrahmens begonnen werden. Nach Lokalisation der die Schulterbasis versorgenden Hauptgefäße mit Hilfe des Operationsmikroskops (Wild M650, Leitz, Schweiz) wird die Rückenhaut achtfach am Titanrahmen fixiert (s. Abb. 4C). Durch Fixation jedes einzelnen Bohrloches wird eine ausreichende Stabilität über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Tagen gewährleistet. Nun wird die Kammer auch im unteren Bereich des Rahmens durch Stichinzisionen mit einer Skalpellklinge in den Hautarealen über den Halteschrauben fixiert. Dazu werden diese vorsichtig mit minimalem Druck durch die kleinen Hautschlitze geführt. Unter Gegenlichtkontrolle markiert man nun den Umriss des Beobachtungsfensters der Gegenseite (s. Abb. 4C). Anschließend werden zunächst die Halteschrauben mit einer Klemme fixiert (s. Abb. 4C). Danach wird die Maus von den Haltefäden gelöst und zur weiteren Präparation auf eine gepolsterte Plexiglasplatte überführt. Nun werden mit Hilfe des Operationsmikroskops im markierten Areal die Cutis, die Subkutis, der Musculus panniculus carnosus und der Musculus retraktor abpräpariert (s. Abb. 4D). Dadurch eröffnet sich der Blick auf die gegenüberliegende Hautmuskulatur und das versorgende Gefäßnetz und ermöglicht so eine spätere Implantation von Zellen und Geweben in dieses Areal (s. Abb. 4E). Es ist zwingend erforderlich, dass der entfernte Hautausschnitt etwas größer ist als das rückwärtige Beobachtungsfenster, um beim Aufsetzen des Kammergegenstücks eine Quetschung der zuführenden Gefäße zu verhindern. Um eine Austrocknung des freigelegten Bereiches zu vermeiden, wird dieser während des Eingriffs mit steriler 0,9%iger Natriumchloridlösung befeuchtet. Nun kann der vordere Titanrahmen nach Entfernung der Klemmen vorsichtig auf die Halteschrauben geschoben und anschließend verschraubt werden. Um eine Verunreinigung durch die Anbringung des vorderen Kammerteils auszuschließen, wird das freigelegte Areal noch einmal mit steriler isotoner Natriumchloridlösung gespült. Unter Zuhilfenahme einer Mikropinzette kann dann das Deckglas in das Beobachtungsfenster eingelegt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass sich dieses luftdicht durch Adhäsion an den Musculus panniculus carnosus anlegt. Das Anbringen eines wieder lösbaren Sprengrings sichert das Deckglas und ermöglicht das Abheben sowie den Austausch am Tag der Implantation. Abschließend werden die überstehenden Halteschrauben mit einer Zange entfernt, um eine Gefährdung des Tieres zu verhindern (s. Abb. 4 F). Das Versuchstier wird nun bis zum Ende der Aufwachphase beobachtet. Eine

Rotlichtlampe sorgt für die Erhaltung einer ausreichend hohen Körpertemperatur. Danach folgt eine 48-stündige Ruhephase mit regulärem Futter- und Trinkwasserangebot. Zur Schmerzlinderung erfolgt postoperativ eine Gabe von 40mg Tramal® pro 100ml Trinkwasser (Tramadolhydrochlorid, Grünenthal GmbH, Aachen) [Lehr et al., 1993, Menger et al., 2002].

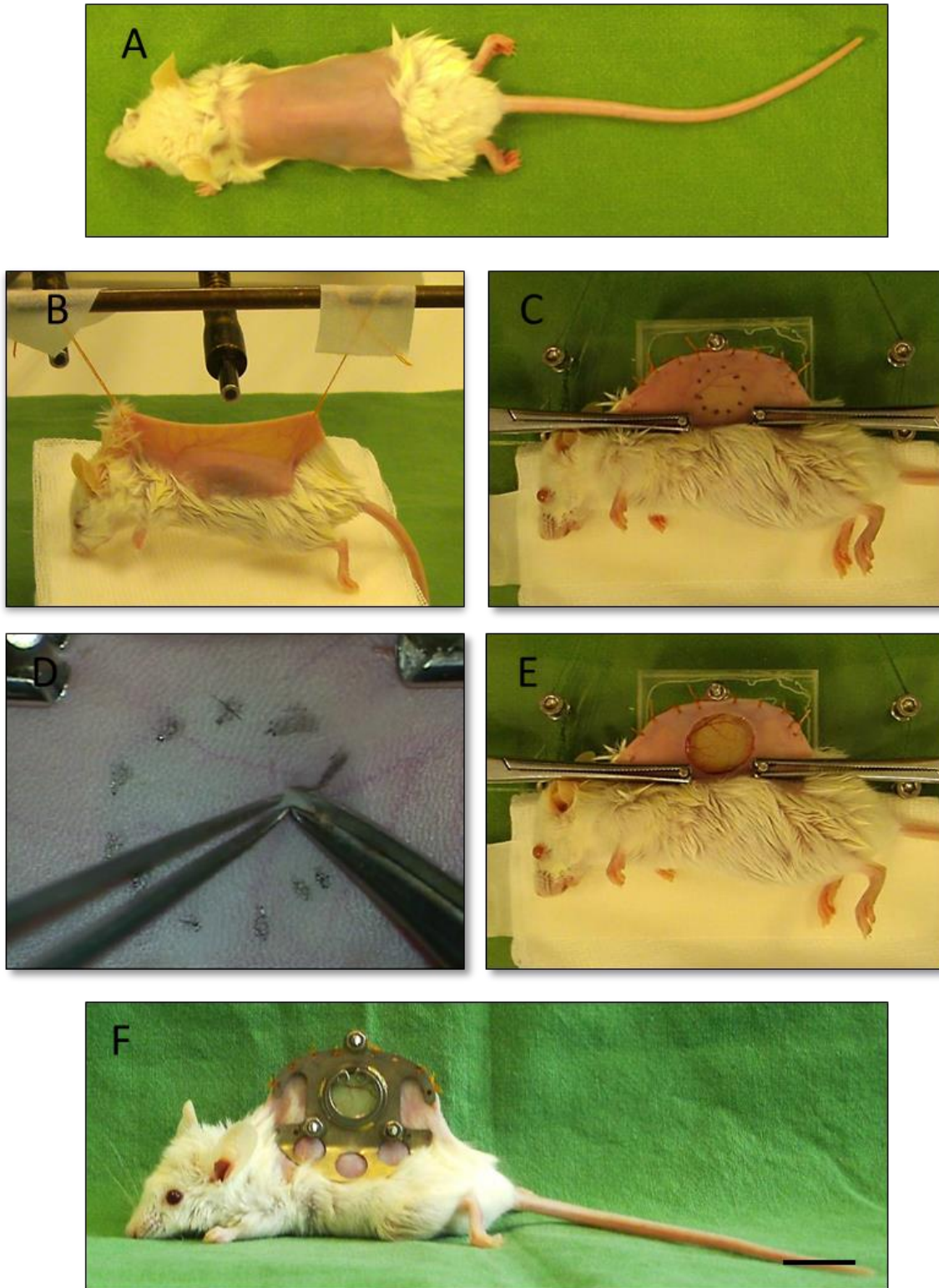


Abbildung 4 : Operationsschritte bei der Präparation der Rückenhautkammer A: Depilierte Rückenhaut B: Fixation der Rückenhaut der Maus mit Haltefäden, C: nach Anbringen des hinteren Kammerrahmens, D: Präparation des Gewebes im späteren Beobachtungsfenster, E: nach Präparation des Gewebes im späteren Beobachtungsfenster, F: fertiggestellte Rückenhautkammer mit Beobachtungsfenster, Maßstab=15 mm

### 3.2.5 Implantation der Tumorzellen

Die Implantation der GFP-transfizierten Tumorzellen erfolgt nach 48-stündiger Erholungsphase am Tag 0 des Versuchsablaufs. Dazu wird die Maus zunächst wie auch schon am Operationstag gewogen und anschließend gewichtsadaptiert anästhesiert. Danach wird das Versuchstier auf der Präparationsplatte fixiert und der Sprengring samt Deckglas abgehoben. Nach Aufbereitung der Tumorzellen erfolgt die umgehende Implantation in die Rückenhautkammer. Mit einer Eppendorfpipette (0,5-10µl) wurde ein Volumen von 2µl Zellsuspension mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen aufgezogen und in das obere Areal im Beobachtungsfenster implantiert. Die exakte Lokalisation wird durch den Verlauf der größeren Versorgungsgefäße bestimmt. Anschließend erfolgt das vorsichtige Verschließen der Kammer mit dem Deckglas. Mittels Intravitalmikroskopie wird die Tumorzellausdehnung anschließend in 40-facher und 100-facher Vergrößerung kontrolliert und dokumentiert (s. Abb.5).

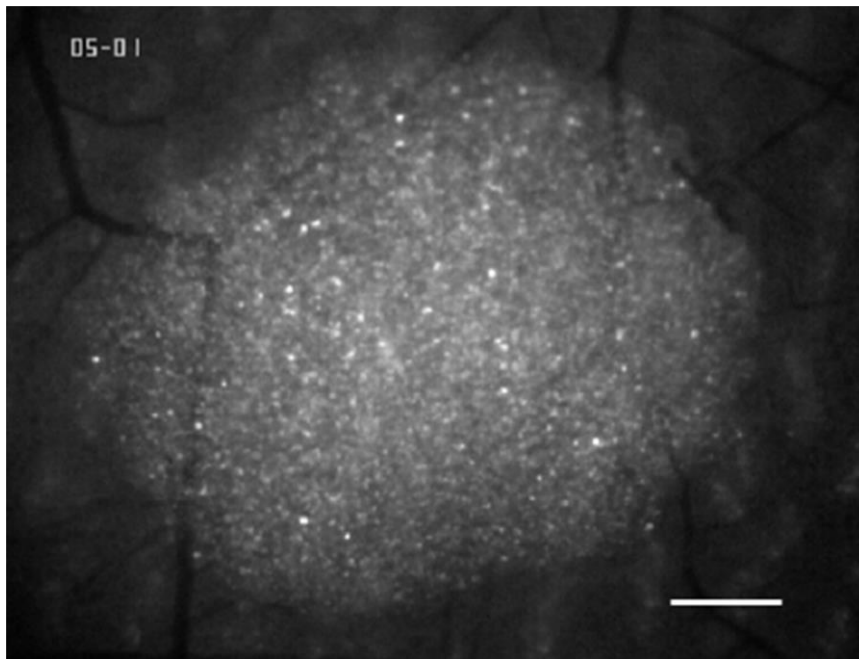


Abbildung 5: GFP-transfizierte CT26.WT Zellen am Tag 0 nach Implantation in die Rückenhautkammer, Maßstab= 300µm



### 3.3 Experimentelles Protokoll

Gruppe Name	Wirkstoff Wirkstoffgruppe	Handelsname Hersteller	Tagesdosis	Injektionsart
1 SHAM	Natriumchlorid 0,9%	Isotone Kochsalzlösung 0,9% Braun Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland	0,2ml	s.c.
2 ENOXA-12	Enoxaparin-Natrium NMH	Clexane® Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland	2x 6mg/kg	s.c.
3 ENOXA-6	Enoxaparin-Natrium NMH	Clexane® Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland	6mg/kg	s.c.
4 FONDA-1,25	Fondaparinux NMH	Arixtra® (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, Deutschland)	1,25mg/kg	s.c.
5 TINZA-10	Tinzaparin-Natrium NMH	innohep® (Leo Pharma GmbH, Neu- Isenburg, Deutschland)	10mg/kg	s.c.
6 TINZA-20	Tinzaparin-Natrium NMH	innohep® (Leo Pharma GmbH, Neu- Isenburg, Deutschland)	20mg/kg	s.c.
7 ASS-18	Acetylsalicylsäure NSAR	ASS® (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland)	18mg/kg	i.p.
8 ASS-85	Acetylsalicylsäure NSAR	ASS® (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland)	85mg/kg	i.p.

Tabelle 2: Versuchsgruppenübersicht

Die in Tab. 2 aufgeführten Substanzen wurden ab dem Tag der Rückenhautkammerpräparation (Tag -2) über einen Zeitraum von 16 Tagen in der oben aufgeführten Dosis zu der jeweils gleichen Tageszeit verabreicht. Die relativ kleine Tagesdosis

wurde mit steriler 0,9%iger Natriumchloridlösung auf ein Volumen von 0,2 ml verdünnt, um eine vollständige Injektion des jeweiligen Wirkstoffes zu gewährleisten. 14 Tage nach Tumorzellimplantation wurde das Gewebe für die Histologie und die Immunhistochemie entnommen (s. Abb. 6).

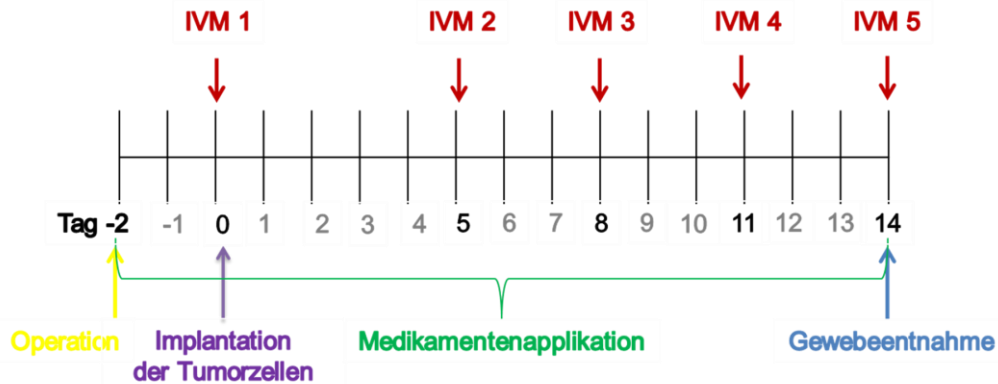


Abbildung 6: Versuchsablauf

### 3.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.4.1 Technik und Durchführung

Die Intravitale-Fluoreszenzmikroskopie eignet sich besonders gut für die nicht invasive, repetitive Untersuchung der Vaskularisierungs- und Wachstumsprozesse von GFP-transfizierten CT26.WT Zellen im Rückenhautkammermodell. Diese Methode wurde bereits durch zahlreiche Versuche verschiedener Arbeitsgruppen etabliert [Debergh et al., 2015, Kollmar et al., 2007, Laschke et al., 2011, Senger et al., 2015]. Vor der Mikroskopie an den Tagen 0, 5, 8, 11 und 14 wurden die Versuchstiere zunächst narkotisiert und dann auf eine Mikroskopierbühne aus Plexiglas überführt.

Um eine hohe Qualität der Aufnahmen zu gewährleisten, muss die Kammer mit einem Bindfaden an den auf der Platte vorgesehenen Halteschrauben fixiert werden. Das Tier wurde nun mitsamt Platte auf dem Objektträgertisch positioniert. Die Intravitalmikroskopie wurde mit Hilfe eines modifizierten Axio-Tech-Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in Aufsicht-Technik durchgeführt. Dazu wurde eine 100 Watt HBO-Quecksilberdampflampe verwendet.

Die Zwischenschaltung eines verschiebbaren Filterblocks mit Blaulichtfilter (450-490nm Exzitations- und >520nm Emissionswellenlänge) ermöglichte eine Anregung des GFP mit Lichtenergie. Eine am Mikroskop angeschlossene CCD Kamera (Pieper, FK 6990-IQ-S, COHU, Prospective Measurements Inc., San Diego, CA, USA) leitete die aufgenommenen Bilder und Videos über einen zwischengeschalteten Videotimer auf einen Bildschirm (VO-5800 PS, Sony, München, Deutschland) und schließlich zur Aufzeichnung des Materials an einen DVD-Recorder (Samsung HR 775-XEG, Samsung Group, Seoul, Südkorea) weiter. Die erfassten Daten wurden am Ende jedes Beobachtungstages zur späteren Analyse auf eine DVD (DVD-R, Imation Europe BV, Hoffddorp, Niederlande) überführt. Neben einem 4-fach Objektiv (UPlanFI, Olympus, Japan, n.A. 0,13) für Übersichtsaufnahmen, wurden ein 10-fach Objektiv (Plan Neoflar, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, n.A. 0,30) sowie ein 20-fach Objektiv (Wasserimmersion: Achroplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, n.A. 0,50) zur Darstellung und Analyse der Einzelzellen, deren Migration und der Angionese in den Beobachtungsarealen genutzt. Die Aufzeichnung an den Einzeltagen erfolgte entsprechend eines genau festgelegten Versuchsprotokolls (s. Abb. 7). Dazu wurde am Tag 0 mit einer Übersichtsaufnahme begonnen. Zudem wurden mit dem 10-fach Objektiv jeweils 4 repräsentative Felder des Tumorrandes sowie des Tumorzentrums entsprechend Abb. 7 aufgezeichnet. An den darauf folgenden Untersuchungstagen wurde zusätzlich eine äquivalente Aufzeichnung mit dem 20-fach Objektiv unter mehrfachem Durchfokussieren des dreidimensionalen Tumorgewebes durchgeführt. Die einzelnen Beobachtungsfelder wurden dabei im Uhrzeigersinn von außen nach innen aufgezeichnet.

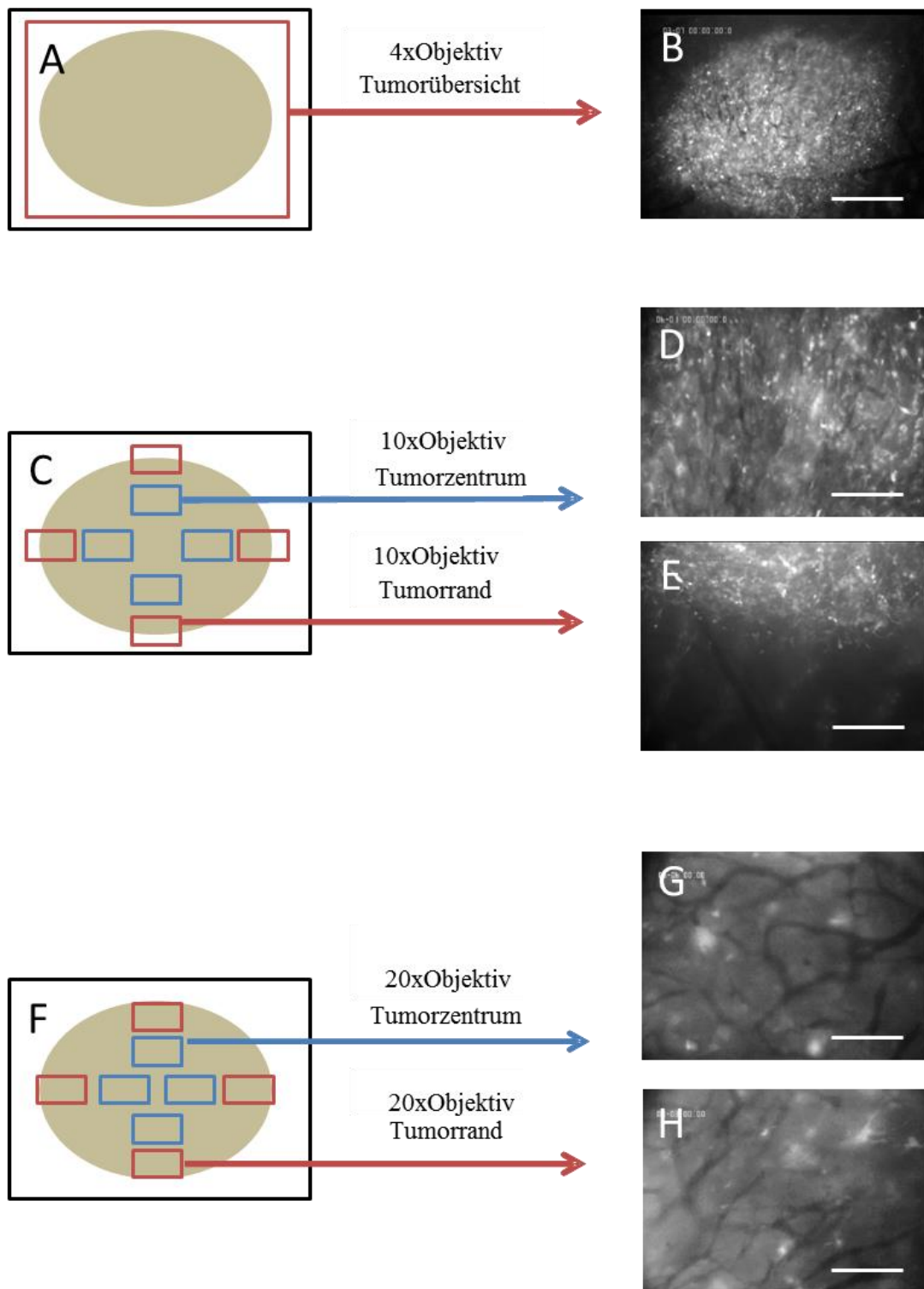


Abbildung 7: Mikroskopierprotokoll; A, B: Tumorübersicht in 40-facher Vergrößerung, Maßstab= 585  $\mu$ m; C: Darstellung von jeweils 4 repräsentativen Feldern im Tumorzentrum (blaue Rechtecke, D) und Tumorrand (rote Rechtecke, E), Maßstab= 234 $\mu$ m; F: Darstellung von jeweils 4 repräsentativen Feldern im Tumorzentrum (blaue Rechtecke, G) und Tumorrand (rote Rechtecke, H), Maßstab= 117 $\mu$ m

### **3.4.2 Auswertung der Videodateien**

Die erfassten Bilddateien wurden off-line durch Wiedergabe der aufgenommenen DVD mit einem computerassistierten Bildverarbeitungssystem ausgewertet (Capimage, Version 6.2., Dr. Zeintl Ingenieurbüro Heidelberg, Deutschland).

Die Übersichtsaufnahmen mit dem 4-fachen Objektiv dienten der Bestimmung der Primärausdehnung der Tumorzellen am Implantationstag sowie der Dokumentation von Tumorfläche, Tumorumfang, Wachstum und Angiogenese im Beobachtungsintervall. Die in 100-facher Vergrößerung erfassten Felder der Tumormitte erlaubten einen ersten detaillierten Überblick über ein Vorhandensein eines möglicherweise neu gebildeten Gefäßgeflechts. Mit den Aufnahmen des 20-fachen Objektivs konnte die funktionelle Kapillardichte in 4 Regions of Interest (ROI) des Randbereichs sowie 4 ROI des Tumorzentrums ermittelt werden. Das mehrfache Durchfokussieren dieser Areale stellte sicher, dass das neugebildete, dreidimensionale Gefäßnetzwerk auf Video aufgezeichnet wurde und der späteren Auswertung zur Verfügung stand. Die Fähigkeit der Tumorzellen, das GFP exprimieren zu können, ermöglichte unter Fluoreszenzlicht eine präzise Abgrenzung der Tumormasse sowie einzelner migrierender GFP-CT26.WT Zellen in das Kammergewebe. Das neu gebildete Gefäßnetzwerk konnte anhand der enthaltenen Erythrozyten identifiziert werden. Durch das in den Erythrozyten enthaltene Hämoglobin ließen sich diese durch ihre dunkle Färbung von den fluoreszierenden GFP-CT26.WT-Zellen abgrenzen.

#### **3.4.2.1 Fläche**

Zur Bestimmung der Tumorgöße wurde die hell leuchtende Tumorzellmasse mit dem Mauszeiger am Computerbildschirm umrandet. Dadurch war es dem Programm möglich, durch Erfassung der in der Umrandung liegenden Bildpunkte die Tumorfläche in mm<sup>2</sup> zu ermitteln.

#### **3.4.2.2 Funktionelle Kapillardichte**

Als funktionelle Kapillardichte wurden jene Kapillaren im Tumorgewebe definiert, in denen sich ein klarer Erythrozytenfluss nachweisen ließ. Alle anderen Gefäße wurden in der Messung nicht berücksichtigt. In jedem der acht mit dem 20-fachen Objektiv aufgenommenen Areale

wurden alle perfundierten Kapillaren mit dem Mauszeiger durch Linien nachgezeichnet. Aus diesem Liniennetzwerk errechnete das Bildverarbeitungssystem die vorliegende Kapillardichte in  $\text{cm/cm}^2$ .

### **3.5 Histologie und Immunhistochemie**

#### **3.5.1 Herstellung der Gewebeproben**

Im Anschluss an die 14-tägige Beobachtungszeit wurde das Versuchstier mit einer Überdosis Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) euthanasiert. Das tumortragende Gewebe der Rückenhautkammer wurde exzidiert, mit mehreren Kanülen auf einer Korkplatte fixiert und zur weiteren Bearbeitung aufgespannt. Mit einer Skalpellklinge wurde der Tumor in zwei gleich große Hälften geteilt. Eine Tumorthälfte wurde zur weiteren Konservierung in eine 4%ige Formalinlösung (Roti®Histofix 4%, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Die andere Hälfte des Gewebestücks wurde in eine Tissue-Tek-Lösung (Jung, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) eingebettet, in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die in Formalin fixierten Proben wurden zur späteren Analyse in Paraffin eingebettet. Durch Entparaffinierung wurden Schnitte von  $5\mu\text{m}$  Dicke angefertigt und zunächst standardmäßig mit Hämatoxylin-Eosin (HE) (s. Abb. 8A) gefärbt, um die Qualität der fixierten Tumore zu beurteilen. Um Aussagen über die Proliferation des Tumorgewebes und dessen programmierten Zelluntergang durch Apoptose treffen zu können, wurden immunhistochemische Markierungen durchgeführt. Als Proliferationsmarker diente PCNA, ein Protein, das in der eukaryotischen DNA-Replikation eine bedeutsame Rolle spielt und somit Rückschlüsse auf Zellteilung und Tumorstadium erlaubt (s. Abb. 8C). Für die Quantifizierung der Apoptoserate wurde der Apoptosemarker Caspase-3, eine für den programmierten Zelltod essentielle Cysteinprotease, detektiert (s. Abb. 8B). Dazu wurden die Gewebeschnitte zu Beginn entparaffiniert und in einem Citraconsäureanhydridpuffer (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) angedaut. Die endogenen Peroxidasen, Biotin und Avidin wurden durch Blockierungsreagenzien (abcam®, Cambridge, England) ausgeschaltet. Anschließend wurden die Primärantikörper, ein anti-cleaved Caspase-3-Antikörper (rabbit-anti-mouse-Antikörper 1:100, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) sowie ein anti-PCNA-Antikörper (mouse-anti-pan-Antikörper 1:200, Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten ein Biotin-markierter goat-anti-rabbit-Antikörper

(abcam®, Cambridge, England) für die Caspase-3 und ein goat-anti-mouse-IgG2a-Antikörper (abcam®, Cambridge, England) für das PCNA. Nach erneuter Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine Streptavidin-Peroxidase-Lösung hinzugefügt. Die Sichtbarmachung des jeweiligen Antigens erfolgte daraufhin durch Zugabe des Chromogens Diaminobenzidin und dessen Umsetzung durch die Peroxidase. Anschließend wurden die Gewebeschnitte nach Meyer in Hämalaun gefärbt und mit Glyceringelatine eingedeckt.

Endothelzellen exprimieren das CD31-Protein, auch PECAM-1 genannt. Diese Eigenschaft wird genutzt, um die Angiogenese in Tumoren zu quantifizieren. Hierzu müssen die Schnitte auch zunächst entparaffiniert und angedaut werden. Als Primärantikörper wurde ein rat-anti-mouse-anti-CD31-Antikörper (1:30, Dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurde ein goat-anti-rat-Cy3-Sekundärantikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubation in einer 37°C feuchten Umgebung wurde eine Kernfärbung mit Bisbenzimid durchgeführt. Im letzten Schritt wurden die fertigen Schnitte ebenfalls mit Glyceringelatine eingedeckt.

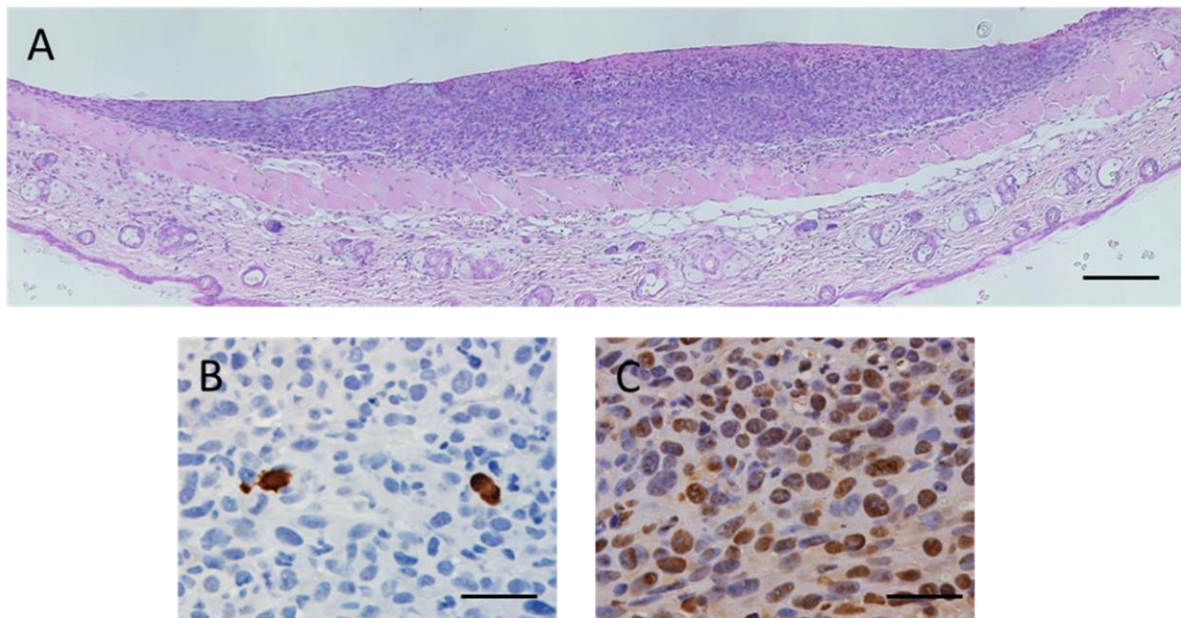


Abbildung 8: A:Tumorübersicht in HE-Färbung, Maßstab=211µm, B:Caspase-3 Färbung, C: PCNA-Färbung, Maßstab=26µm

### **3.5.2 Auswertung**

Die semiquantitative Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte innerhalb weniger Tage, um ein Ausbleichen der Färbungen zu verhindern. Die Caspase-3- und PCNA-Präparate wurden in Durchlichttechnik mit dem Olympus Mikroskop (Olympus BX60F, Olympus Optical CO. LTD., Japan) ausgezählt. Zur Beurteilung der Zellproliferation wurde zunächst die Anzahl von PCNA-positiven Zellen pro High-Power-Field (HPF) in % erfasst. Daraus wurde anhand folgendem Schema ein semiquantitativer Score gebildet. Für Werte <1% wurden 0 Punkte, für Werte von 1-10% wurde 1 Punkt, für Werte von 11-30% wurden 2 Punkte, für Werte von 31-50% wurden 3 Punkte und für Werte >50% wurden 4 Punkte vergeben. Die Apoptoserate wurde als absolute Anzahl der Caspase-3-positiven Zellen pro HPF festgelegt. Die Angiogenese wurde zunächst mit Hilfe eines speziellen Fluoreszenz-Mikroskops (BZ 8001 (Biozero), Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) als Anzahl PECAM-1-positiver Endothelzellen pro HPF erfasst und dann in Anzahl PECAM-1-positiver Zellen/mm<sup>2</sup> umgewandelt.

### **3.6 Statistik**

Die tabellarische Datenerfassung erfolgte zunächst mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten). Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Anschließend wurden die statistischen Analysen mit Hilfe der SigmaPlot Software (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Nach einer Prüfung auf Normalverteilung und Homogenität der Varianz in den verschiedenen Versuchsgruppen wurden zunächst Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Varianzanalyse (ANOVA) eruiert. Im Anschluss wurde dann ein entsprechender Post-Hoc-Test (Bonferroni-Korrektur) durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.



## **4 Ergebnisse**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung der NMH Enoxaparin-Natrium, Fondaparinux und Tinzaparin-Natrium sowie des nicht steroidalen Antirheumatikums Acetylsalicylsäure auf GFP-transfizierte CT-26.WT Kolonkarzinomzellen in-vivo untersucht. Hierbei wurde im Speziellen die Wirkung auf die Tumorgröße, die Zellproliferation, die Angiogenese sowie auf die Tumorzellapoptose ermittelt. An den einzelnen Beobachtungstagen, wie auch im Abschnitt 5.4 beschrieben, werden die Ergebnisse der Tumorgröße sowie der Angiogenese der einzelnen Substanzgruppen mit der Kontrollgruppe verglichen. Die am Beobachtungstag 14 erhobenen Ergebnisse der PCNA-, Caspase-3- und PECAM-1-Färbungen werden ebenfalls der Kontrollgruppe gegenübergestellt (s. Abschnitt 3.5).

### **4.1 Enoxaparin-Natrium**

#### **4.1.1 Tumorwachstum**

Die Messung des Tumorwachstums erfolgte an den Beobachtungstagen 0, 5, 8, 11 und 14 durch die Bestimmung der Tumorfläche mit Hilfe der IVM. Dabei wurde der prozentuale Zuwachs der Tumorfläche im 14-tägigen Beobachtungsintervall bestimmt. Die Abb. 9 zeigt eine stetige Zunahme der Tumorfläche in allen 3 Versuchsgruppen nach Tumorzellimplantation. Eine Behandlung der Tiere mit ENOXA-6 bzw. ENOXA-12 führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner signifikanten Reduktion der Tumorfläche.

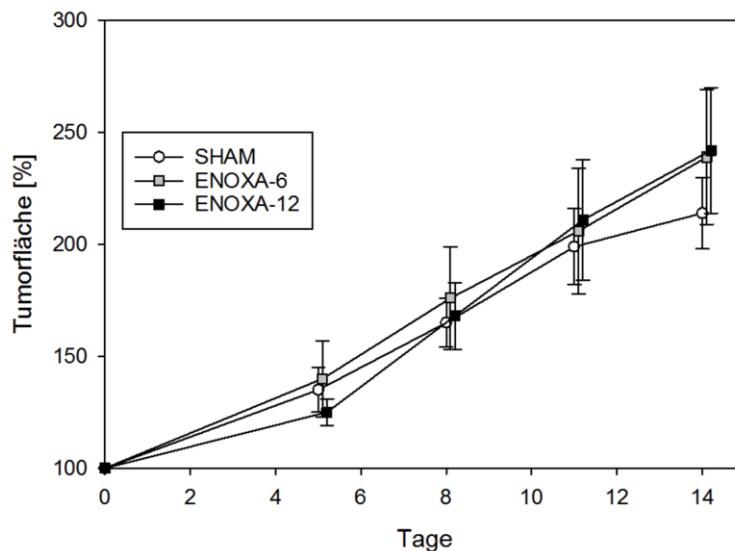


Abbildung 9: Analyse der Tumorfläche (Zuwachs in %) über einen 14-tägigen Beobachtungszeitraum nach Tumorzellimplantation unter täglicher Behandlung mit 1x6mg/kg (ENOX-6, schwarze Quadrate) bzw. 2x6mg/kg (ENOX-12, graue Quadrate) Enoxaparin-Natrium im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weiße Kreise). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben.

#### 4.1.2 Tumorangiogenese

Mit Hilfe der IVM wurde die Tumorangiogenese durch Messung der Kapillardichte im Tumorrand und im Tumorzentrum an den Beobachtungstagen 5, 8, 11 und 14 untersucht (s. Abb. 10). Die Abb. 10 demonstriert eine Zunahme der Kapillardichte im Bereich des Tumorrandes und des Tumorzentrums über den gesamten Beobachtungszeitraum. Die Behandlung der Tiere mit ENOX-6 und ENOX-12 zeigt eine geringere, jedoch nicht signifikante Verringerung der Tumorangiogenese im Bereich des Tumorrandes und des Tumorzentrums im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen den beiden ENOX-Dosierungen lässt sich kein relevanter Unterschied eruieren.

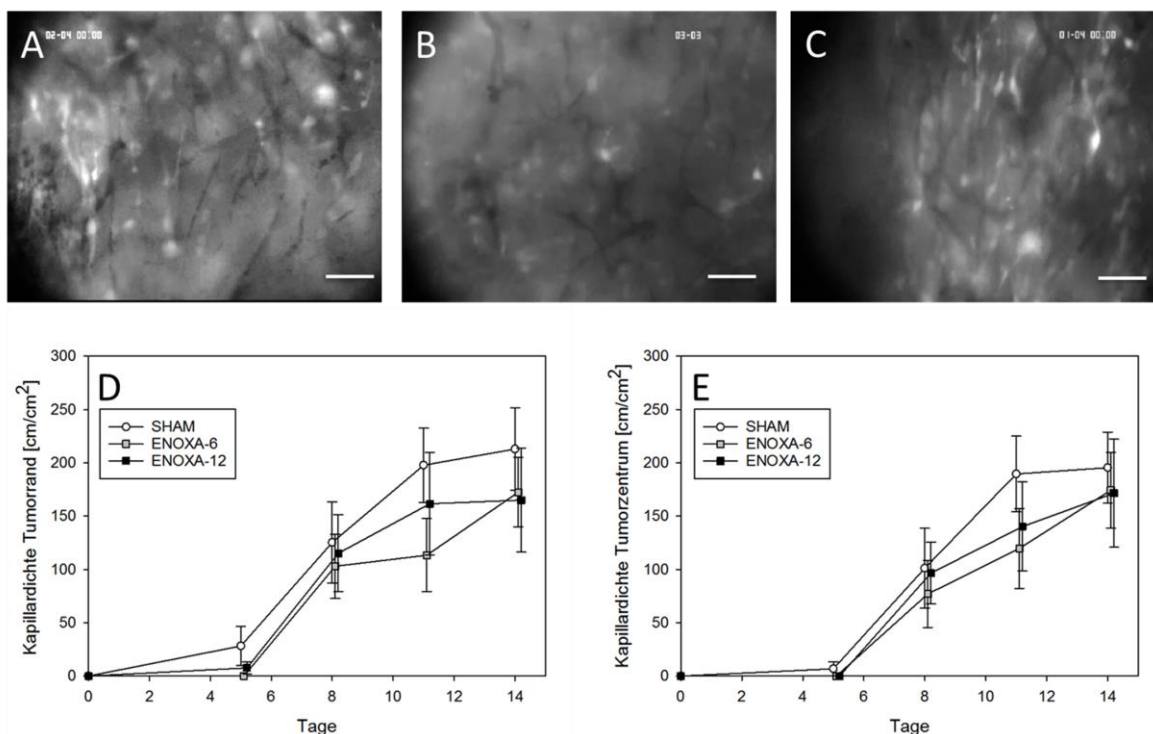


Abbildung 10: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen der kapillaren Perfusion des Tumorrandes an Tag 14 nach Tumorzellimplantation. Sham-Behandlung (A) bzw. tägliche Behandlung mit 1x6mg/kg (B, ENOX-6) oder 2x6mg/kg (C, ENOX-12) Enoxaparin-Natrium, Maßstab=60µm. D und E: Quantitative Analyse der Kapillardichte (in cm/cm<sup>2</sup>) im Tumorrand (D) und im Tumorzentrum (E) unter Behandlung mit ENOX-6 (graue Quadrate) oder ENOX-12 (schwarze Quadrate) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weiße Kreise). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben.

Die Kapillardichte wurde zusätzlich zur IVM am Beobachtungstag 14 durch eine immunhistochemische Färbung mit dem PECAM-1-Antikörper bestimmt. Wie in Abb. 11 erkennbar, kann durch die Behandlung mit ENOX-6 im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Unterschied in der Anzahl PECAM-1-positiver Zellen in der immunhistochemischen Färbung festgestellt werden. Die Behandlung mit ENOX-12 führt zu einer leicht jedoch nicht signifikant erhöhten Anzahl PECAM-1-positiver Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

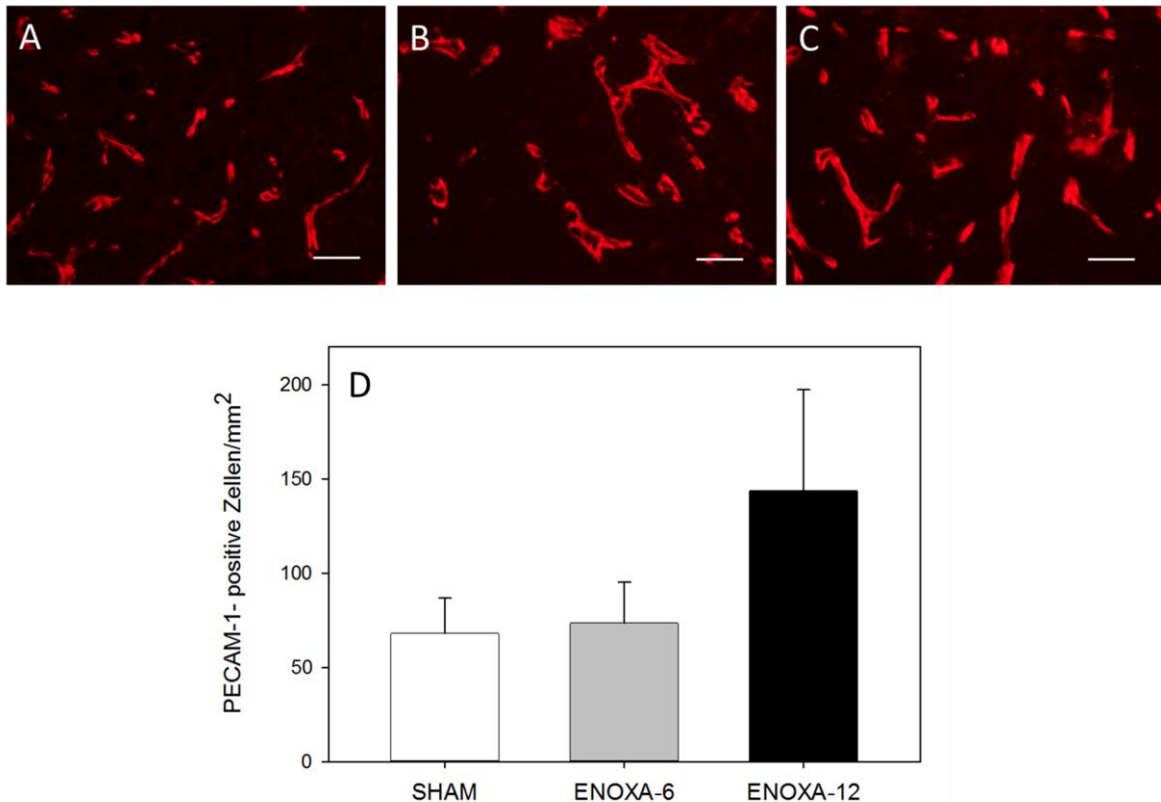


Abbildung 11: Repräsentative immunhistochemische Aufnahmen der PECAM-1-positiven Zellen im Tumorgewebe an Tag 14 nach Tumorzellimplantation. Sham-Behandlung (A) bzw. tägliche Behandlung mit 1x6mg/kg (B, ENOXA-6) oder 2x6mg/kg (C, ENOXA-12) Enoxaparin-Natrium, Maßstab=16µm. D: Quantitative Analyse der Kapillardichte (PECAM-1-positiv Zellen/mm<sup>2</sup>) im Tumorgewebe unter Behandlung mit ENOXA-6 (grauer Balken) oder ENOXA-12 (schwarzer Balken) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weißer Balken). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben.

#### 4.1.3 Tumorzellproliferation und Tumorzellapoptose

Die Tumorzellapoptose wurde am Beobachtungstag 14 durch eine immunhistochemische Färbung mit dem Apoptose-Marker Caspase-3 bestimmt, die Zellproliferation durch eine immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker PCNA. Die Behandlung der Tiere mit ENOXA-6 und ENOXA-12 zeigt keinen Einfluss auf die Anzahl der Caspase-3-positiven Zellen am Beobachtungstag 14 im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 12A). Die Behandlung mit ENOXA-6 bzw. ENOXA-12 führt auch nicht zu einer Beeinflussung der PCNA-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb.12B).

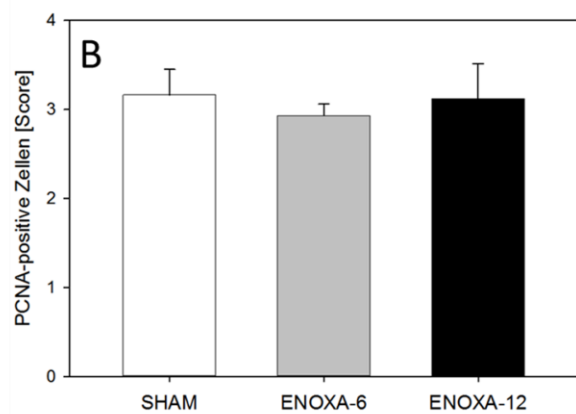
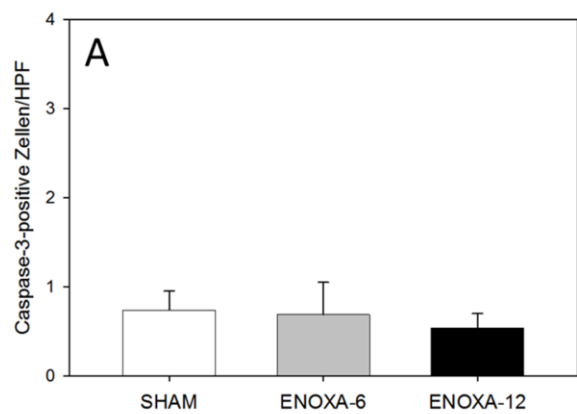


Abbildung 12: Analyse der Tumorzellapoptose (A, Caspase-3-positive Zellen/HPF) sowie der Tumorzellproliferation (B, PCNA-positive Zellen als semiquantitativer Score) im Tumorgewebe an Tag 14 nach Tumorzellimplantation unter Behandlung mit 1x6mg/kg (ENOX-6, grauer Balken) oder 2x6mg/kg (ENOX-12, schwarzer Balken) Enoxaparin-Natrium im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weißer Balken). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben.

## 4.2 Fondaparinux

### 4.2.1 Tumorwachstum

Über den 14-tägigen Beobachtungszeitraum zeigt sich in den beiden Versuchsgruppen eine stetige Zunahme der Tumorfläche. Eine Behandlung der Tiere mit FONDA-1,25 führt zu keiner signifikanten Reduktion der Tumorfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 13)

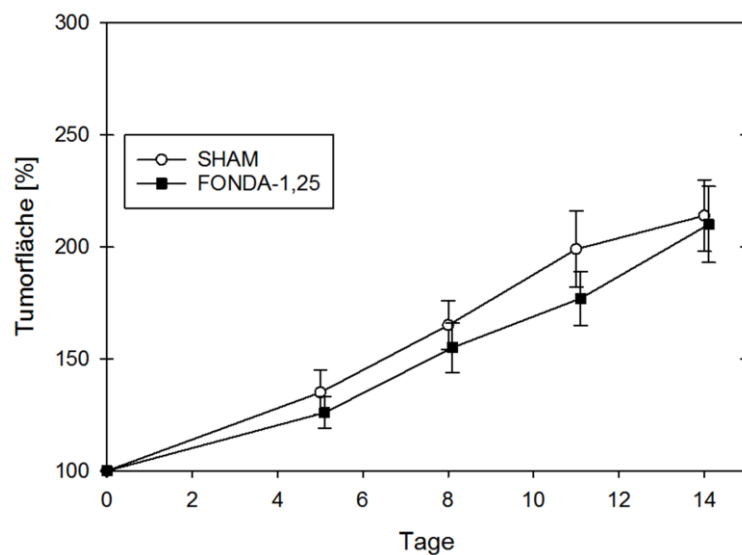


Abbildung 13: Analyse der Tumorfläche (Zuwachs in %) über einen 14-tägigen Beobachtungszeitraum nach Tumorzellimplantation unter täglicher Behandlung mit 1,25mg/kg Fondaparinux (FONDA-1,25, schwarze Quadrate) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weiße Kreise). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben.

### 4.2.2 Tumorangiogenese

Über den 14-tägigen Beobachtungszeitraum zeigt sich in beiden Versuchsgruppen eine kontinuierliche Zunahme der Kapillardichte sowohl am Tumorrand als auch im Tumorzentrum (s. Abb. 14). Eine Behandlung mit FONDA-1,25 führt an den Beobachtungstagen 8 und 14 aufgrund der hohen Standardabweichung zu einer nicht signifikanten Verringerung der Kapillardichte in der Tumorperipherie und im Tumorzentrum. Am Beobachtungstag 11 führt die Behandlung mit FONDA-1,25 zu einer signifikanten Reduktion der Kapillardichte in den ROI.

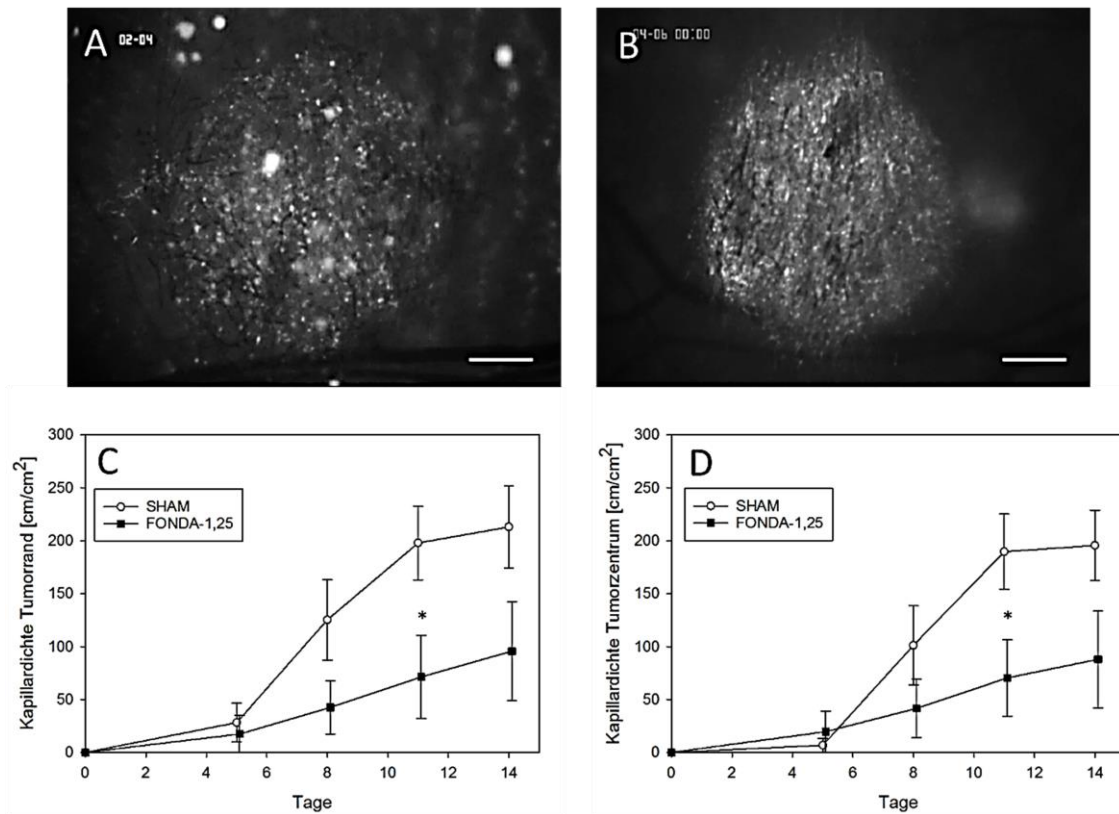


Abbildung 14: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen der kapillaren Perfusion des Tumors an Tag 14 nach Tumorzellimplantation. Sham-Behandlung (A) bzw. tägliche Behandlung mit 1,25mg/kg Fondaparinux (B, FONDA-1,25), Maßstab=300µm. C und D: Quantitative Analyse der Kapillardichte (in cm/cm<sup>2</sup>) im Tumorrand (C) und im Tumorzentrum (D) unter Behandlung mit FONDA-1,25 (schwarze Quadrate) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weiße Kreise). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben. \*p<0,05 versus SHAM.

Eine Behandlung der Tiere mit FONDA-1,25 führt am Beobachtungstag 14 nach Tumorzellimplantation in der immunhistochemischen Färbung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer geringeren, jedoch nicht signifikanten Verringerung der Anzahl von PECAM-1-positiven Zellen (s. Abb. 15).

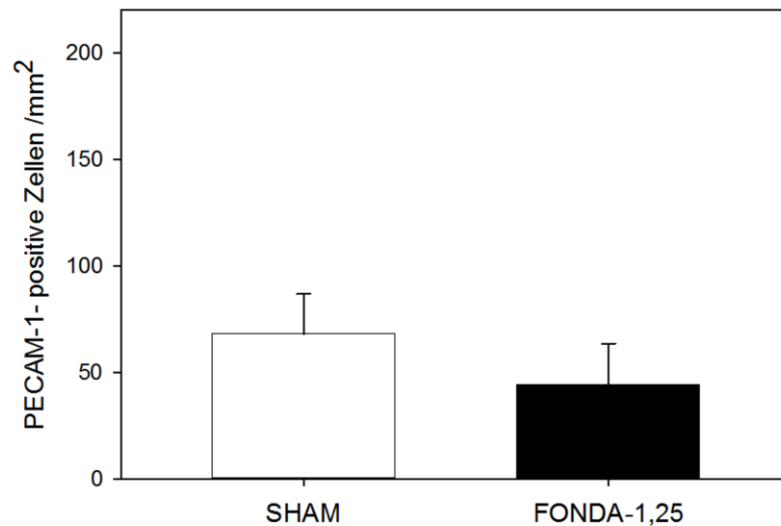


Abbildung 15: Quantitative Analyse der Kapillardichte (PECAM-1-positive Zellen/mm<sup>2</sup>) im Tumorgewebe an Tag 14 nach Tumorzellimplantation unter Behandlung mit 1,25mg/kg Fondaparinux (FONDA-1,25, schwarzer Balken) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weißer Balken). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben.

#### 4.2.3 Tumorzellproliferation und Tumorzellapoptose

Die Behandlung mit FONDA-1,25 führt zu keiner signifikanten Änderung der Tumorzellapoptose (s. Abb. 16A). Die Analyse der PCNA-positiven Zellen zeigt am Beobachtungstag 14 nach Tumorzellimplantation ebenso keinen relevanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit FONDA-1,25 behandelten Versuchsgruppe (s. Abb. 16B).



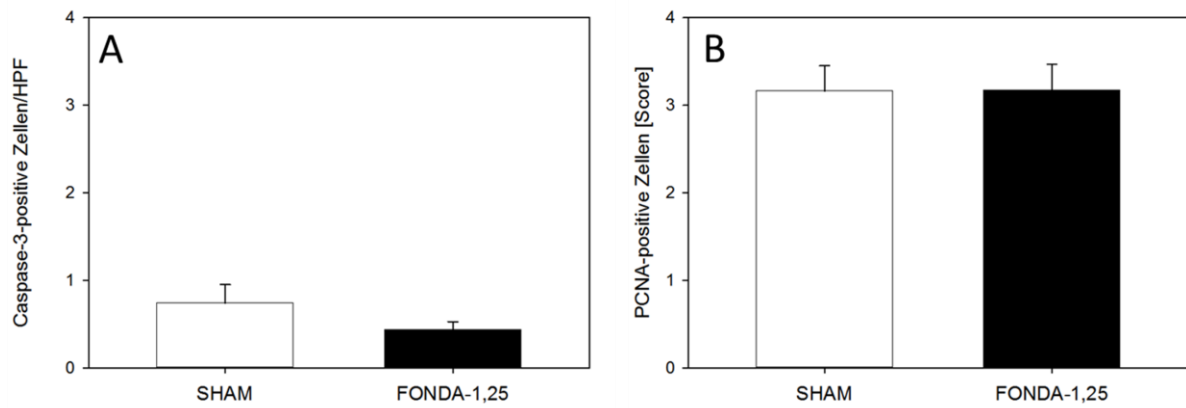


Abbildung 16: Analyse der Tumorzellapoptose (A, Caspase-3-positive Zellen/HPF) sowie der Tumorzellproliferation (B, PCNA-positive Zellen als semiquantitative Score) im Tumorgewebe an Tag 14 nach Tumorzellimplantation unter Behandlung mit 1,25mg/kg Fondaparinux (FONDA-1,25, schwarzer Balken) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weißer Balken). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben.

## 4.3 Tinzaparin-Natrium

### 4.3.1 Tumorwachstum

Die Abb. 17 zeigt ein stetiges Wachstum der Tumorfläche über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. Eine Behandlung mit TINZA-10 und TINZA-20 führt zu keiner signifikanten Reduktion des Tumorwachstums gemessen an der Tumorfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen den beiden Tinzaparin-Natrium Dosierungen lässt sich ebenfalls kein bedeutsamer Unterschied erkennen.

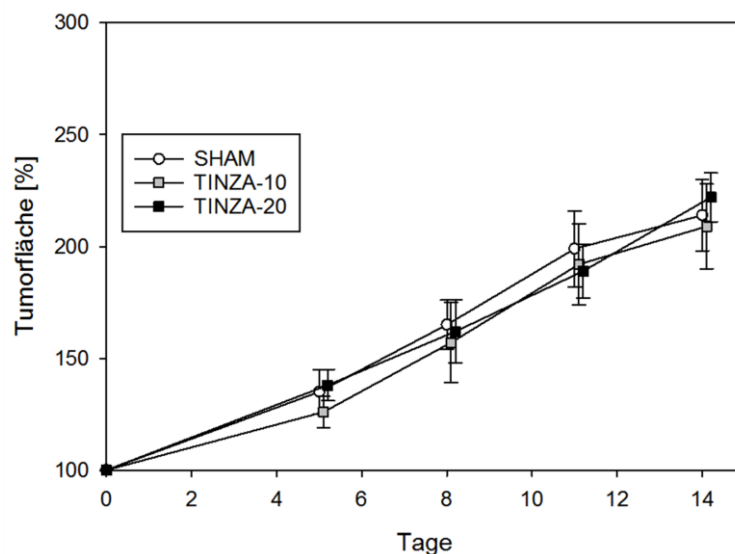


Abbildung 17: Analyse der Tumorfläche (Zuwachs in %) über einen 14-tägigen Beobachtungszeitraum nach Tumorzellimplantation unter täglicher Behandlung mit 10mg/kg (TINZA-10, graue Quadrate) bzw. 20mg/kg (TINZA-20, schwarze Quadrate) Tinzaparin-Natrium im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weiße Kreise). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben.

### 4.3.2 Tumorangiogenese

Eine Behandlung der Tiere mit TINZA-10 führt im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer deutlichen Reduktion der Kapillardichte im Tumorrand an den Beobachtungstagen 5, 8 und 14 und im Tumorzentrum an den Beobachtungstagen 8 und 14. Die Reduktion ist allerdings im Mehrgruppenvergleich nicht signifikant. Nur am Beobachtungstag 11 kann eine signifikante Verminderung der Kapillardichte im Tumorrand und im Tumorzentrum nachgewiesen werden.

Eine Behandlung der Tiere mit TINZA-20 reduziert die Kapillardichte im Vergleich zur Kontrollgruppe, weist aber im Vergleich zur Behandlung mit TINZA-10 einen deutlich geringeren Effekt auf (s. Abb. 18).

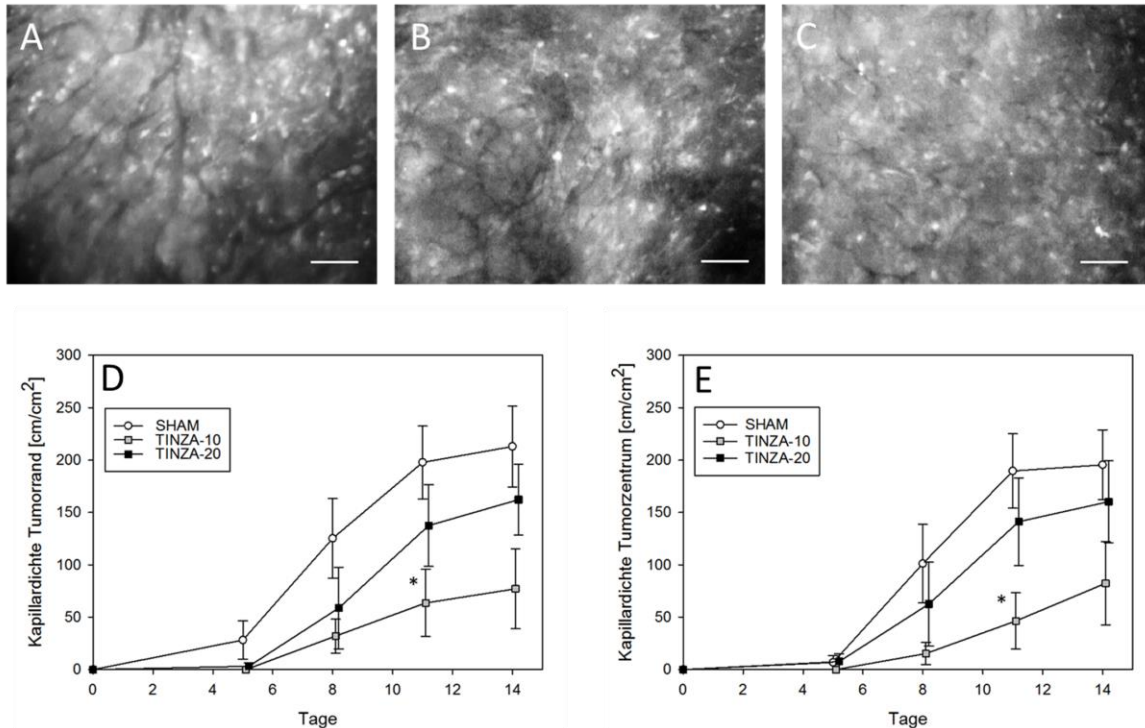


Abbildung 18: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen der kapillaren Perfusion des Tumorzentrums an Tag 14 nach Tumorzellimplantation. Sham-Behandlung (A) bzw. tägliche Behandlung mit 10mg/kg (B, TINZA-10) oder 20mg/kg (C, TINZA-20) Tinzaparin-Natrium, Maßstab=120µm. D und E: Quantitative Analyse der Kapillardichte (in cm/cm<sup>2</sup>) im Tumorrand (D) und im Tumorzentrum (E) unter Behandlung mit TINZA-10 (graue Quadrate) oder TINZA-20 (schwarze Quadrate) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weiße Kreise). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben. \*p<0,05 versus SHAM.

Die immunhistochemische Analyse der Kapillardichte zeigt am Tag 14 für die Behandlung mit TINZA-10 eine verringerte Anzahl PECAM-1-positiver Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Applikation von TINZA-20 führt am Beobachtungstag 14 im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie zu TINZA-10 zu einer nicht signifikanten Erhöhung der Anzahl PECAM-1-positiver Zellen (s. Abb. 19).

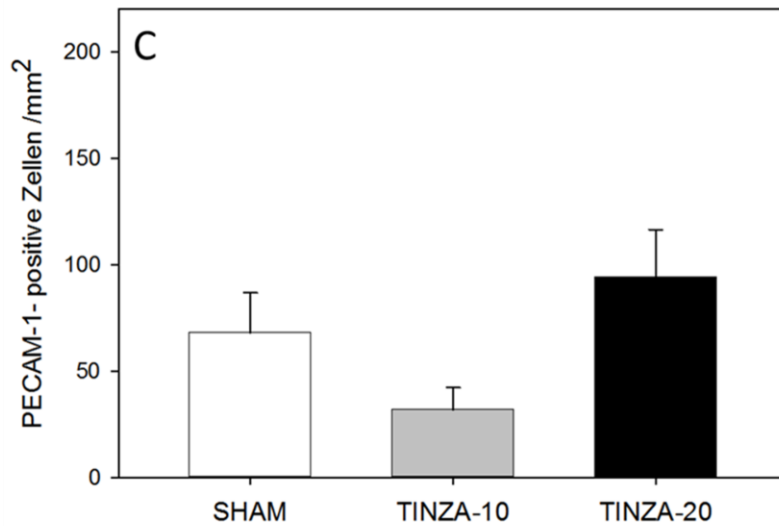
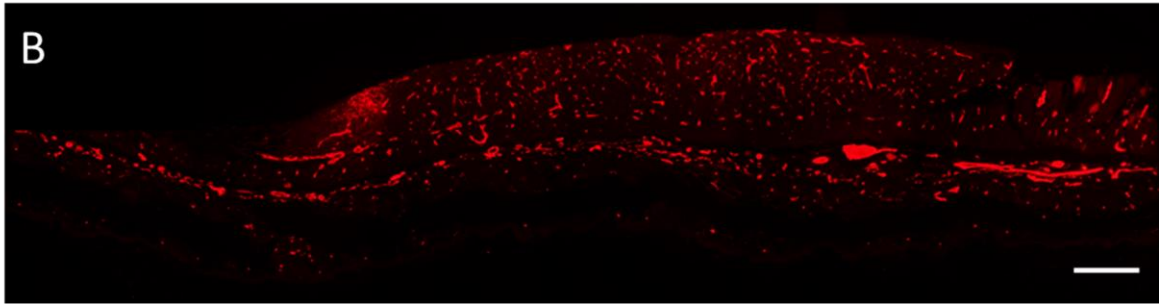
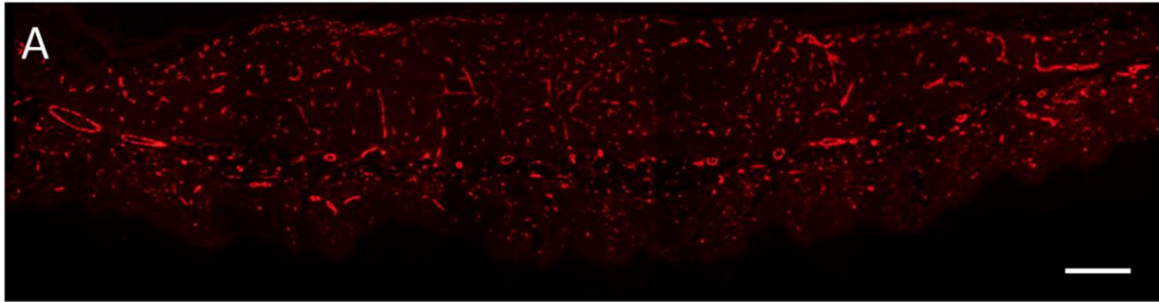


Abbildung 19: Repräsentative immunhistochemische Übersichtsaufnahmen der PECAM-1-positiven Zellen im Tumorgewebe an Tag 14 nach Tumorzellimplantation. Sham-Behandlung (A) bzw. tägliche Behandlung mit 10mg/kg Tinzaparin-Natrium (B, TINZA-10), Maßstab=211 $\mu$ m. C: Quantitative Analyse der Kapillardichte (PECAM-1-positiv Zellen/mm<sup>2</sup>) im Tumorgewebe unter Behandlung mit TINZA-10 (grauer Balken) oder TINZA-20 (schwarzer Balken) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weißer Balken). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben.

### 4.3.3 Tumorzellproliferation und Tumorzellapoptose

Eine Verabreichung von TINZA-10 bzw. TINZA-20 führt am Beobachtungstag 14 zu keiner bedeutsamen Veränderung der Tumorzellapoptose im Vergleich zur Kontrollgruppe. Betrachtet man die Tumorzellproliferation unter Behandlung mit Tinzaparin-Natrium, so zeigt sich eine signifikante Verringerung der PCNA-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen TINZA-10 und TINZA-20 lässt sich kein Unterschied feststellen (s. Abb. 20).

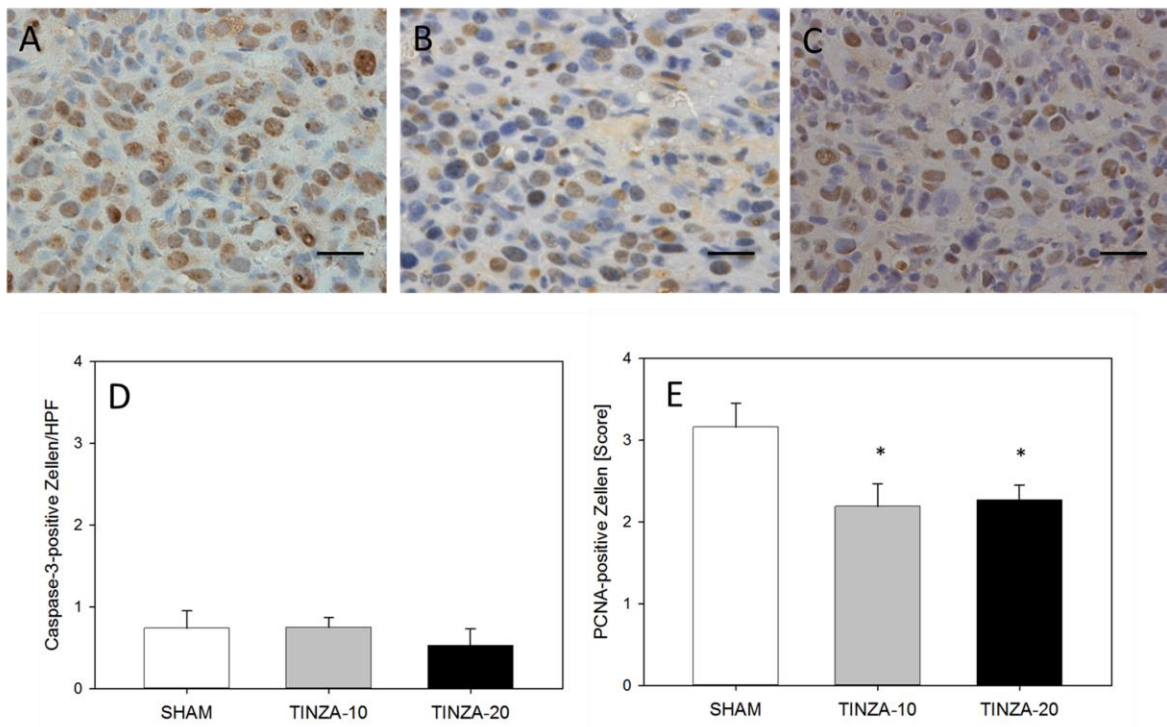


Abbildung 20: Repräsentative Aufnahmen der PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe an Tag 14 nach Tumorzellimplantation. Sham-Behandlung (A) bzw. tägliche Behandlung mit 10mg/kg (B, TINZA-10) oder 20mg/kg (C, TINZA-20) Tinzaparin-Natrium, Maßstab=16µm. D und E: Analyse der Tumorzellapoptose (D, Caspase-3-positive Zellen/HPF) sowie der Tumorzellproliferation (E, PCNA-positive Zellen als semiquantitativer Score) unter Behandlung mit TINZA-10 (grauer Balken) oder TINZA-20 (schwarzer Balken) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weißer Balken). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben. \* $p < 0,05$  versus SHAM.

## 4.4 Acetylsalicylsäure

### 4.4.1 Tumorwachstum

Die Versuchsgruppen zeigen über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen einen kontinuierlichen Zuwachs der Tumorfläche. Für die Behandlung mit ASS-18 bzw. ASS-85 lässt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Reduktion der Tumorfläche über den gesamten Untersuchungszeitraum darstellen (s. Abb. 21).

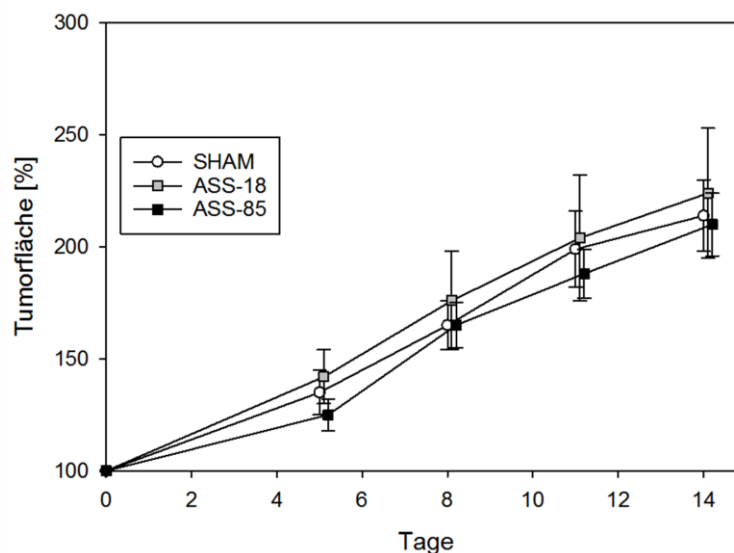


Abbildung 21: Analyse der Tumorfläche (Zuwachs in %) über einen 14-tägigen Beobachtungszeitraum nach Tumorzellimplantation unter täglicher Behandlung mit 18mg/kg (ASS-18, graue Quadrate) bzw. 85mg/kg (ASS-85, schwarze Quadrate) Acetylsalicylsäure im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weiße Kreise). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben.

### 4.4.2 Tumorangiogenese

Alle 3 Versuchsgruppen zeigen über den 14-tägigen Beobachtungszeitraum eine kontinuierliche Zunahme der Kapillardichte. Eine Behandlung mit Acetylsalicylsäure reduziert die Kapillardichte in der Peripherie und im Zentrum der implantierten Tumore über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe vor allem an den Tagen 8, 11 und 14. Die Reduktion ist im Mehrgruppenvergleich allerdings nicht signifikant. Für ASS-85 kann eine stärkere Reduktion der Kapillardichte erreicht werden als für ASS-18. Für die

Tage 8 und 14 kann für die Reduktion der Kapillardichte aufgrund der großen Standardabweichung keine Signifikanz erreicht werden. Am Beobachtungstag 11 führt die Applikation von ASS-85 zu einer signifikanten Reduktion der Kapillardichte im Tumorrand im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 22).

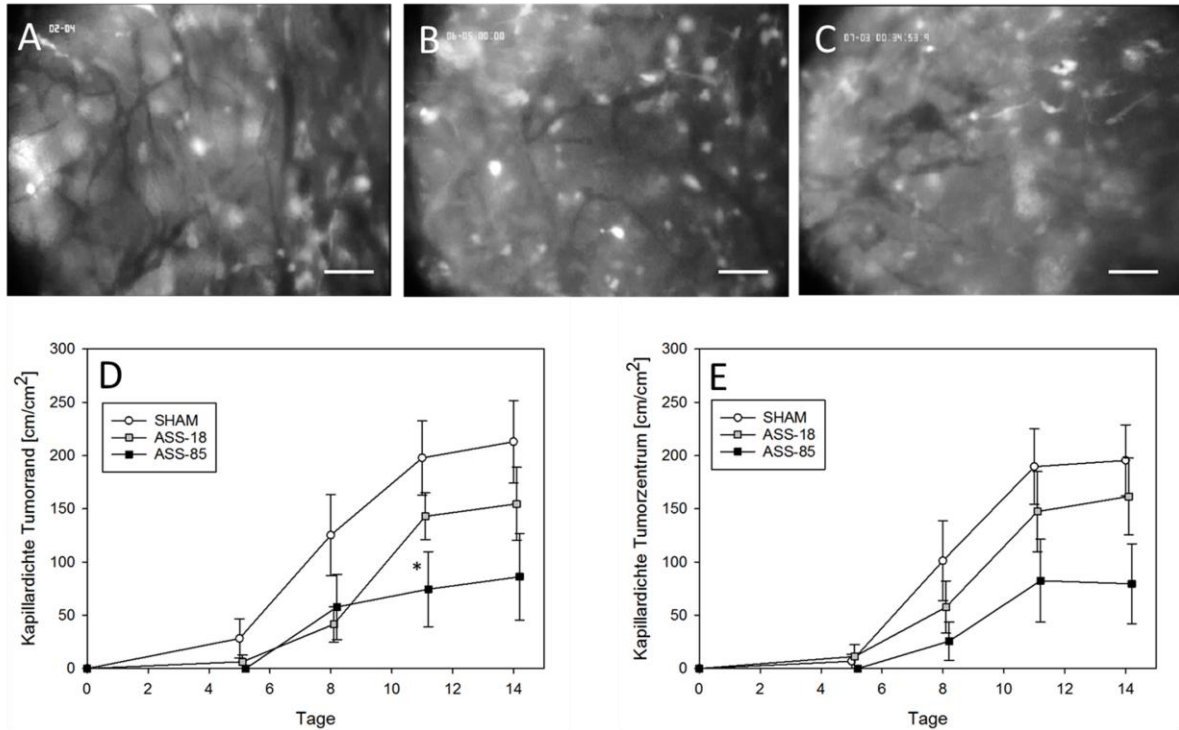


Abbildung 22: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen der kapillaren Perfusion des Tumorrandes an Tag 11 nach Tumorzellimplantation. Sham-Behandlung (A) bzw. tägliche Behandlung mit 18mg/kg (B, ASS-18) oder 85mg/kg (C, ASS-85) Acetylsalicylsäure, Maßstab=60µm. D und E: Quantitative Analyse der Kapillardichte (in cm/cm<sup>2</sup>) im Tumorrand (D) und im Tumorzentrum (E) unter Behandlung mit ASS-18 (graue Quadrate) oder ASS-85 (schwarze Quadrate) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weiße Kreise). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben. \*p<0,05 versus SHAM.

Eine Behandlung der Tiere mit Acetylsalicylsäure führt am Beobachtungstag 14 zu einer leichten, nicht signifikanten Verringerung der Anzahl von PECAM-1-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für ASS-85 kann eine stärkere Reduktion der Zahl PECAM-1-positiver Zellen erreicht werden. Allerdings ist auch hier der Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht signifikant (s. Abb.23).

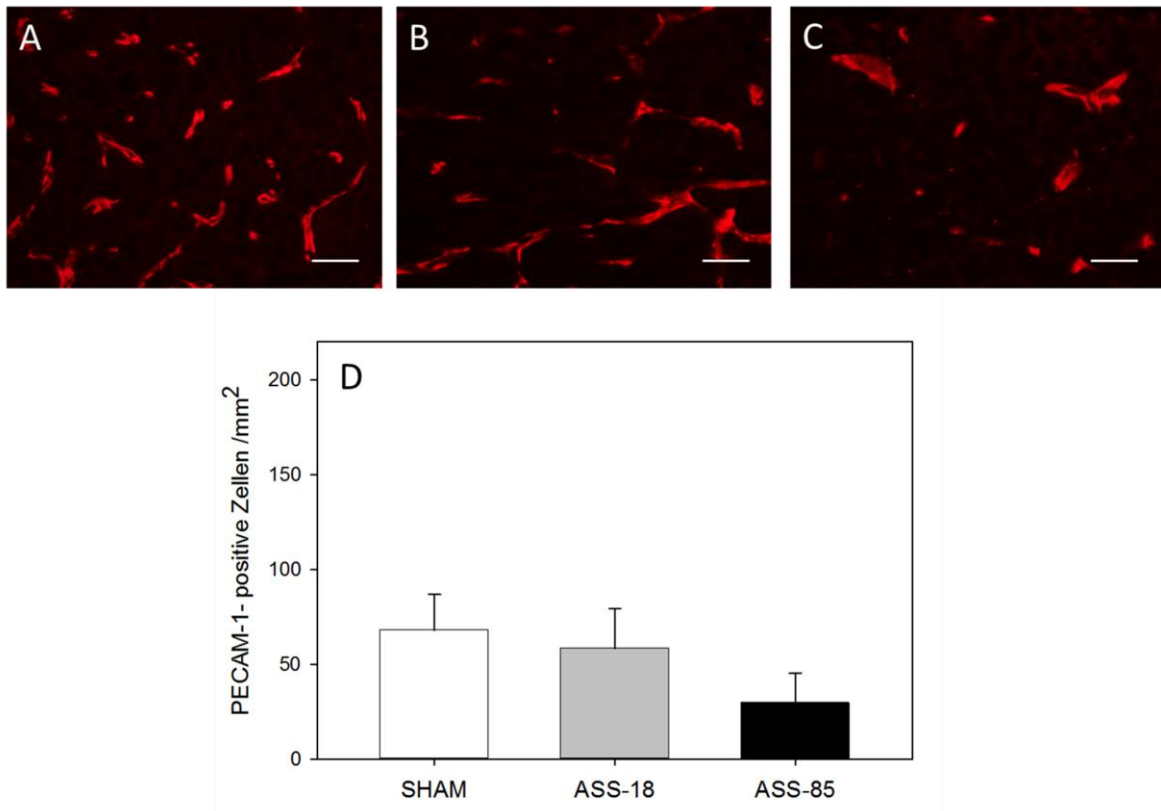


Abbildung 23: Repräsentative immunhistochemische Aufnahmen der PECAM-1-positiven Zellen im Tumorgewebe am Tag 14 nach Tumorzellimplantation. Sham-Behandlung (A) bzw. tägliche Behandlung mit 18mg/kg (B, ASS-18) oder 85mg/kg (C, ASS-85) Acetylsalicylsäure, Maßstab=16µm. D: Quantitative Analyse der Kapillardichte (PECAM-1-positiv Zellen/mm<sup>2</sup>) im Tumorgewebe unter Behandlung mit ASS-18 (grauer Balken) oder ASS-85 (schwarzer Balken) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weißer Balken). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben.

#### 4.4.3 Tumorzellproliferation und Tumorzellapoptose

Entsprechend Abb. 24D bewirkt die Behandlung mit ASS-85 eine Steigerung der Tumorzellapoptose am Beobachtungstag 14 im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Behandlung mit ASS-18. Für die Applikation von ASS-85 im Vergleich zu ASS-18 war die Erhöhung der Anzahl von Caspase-3-positiven Zellen signifikant. Eine Behandlung mit Acetylsalicylsäure führt zudem am Beobachtungstag 14 zu einer leichten, aber nicht signifikanten Verminderung der Tumorzellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 24E).



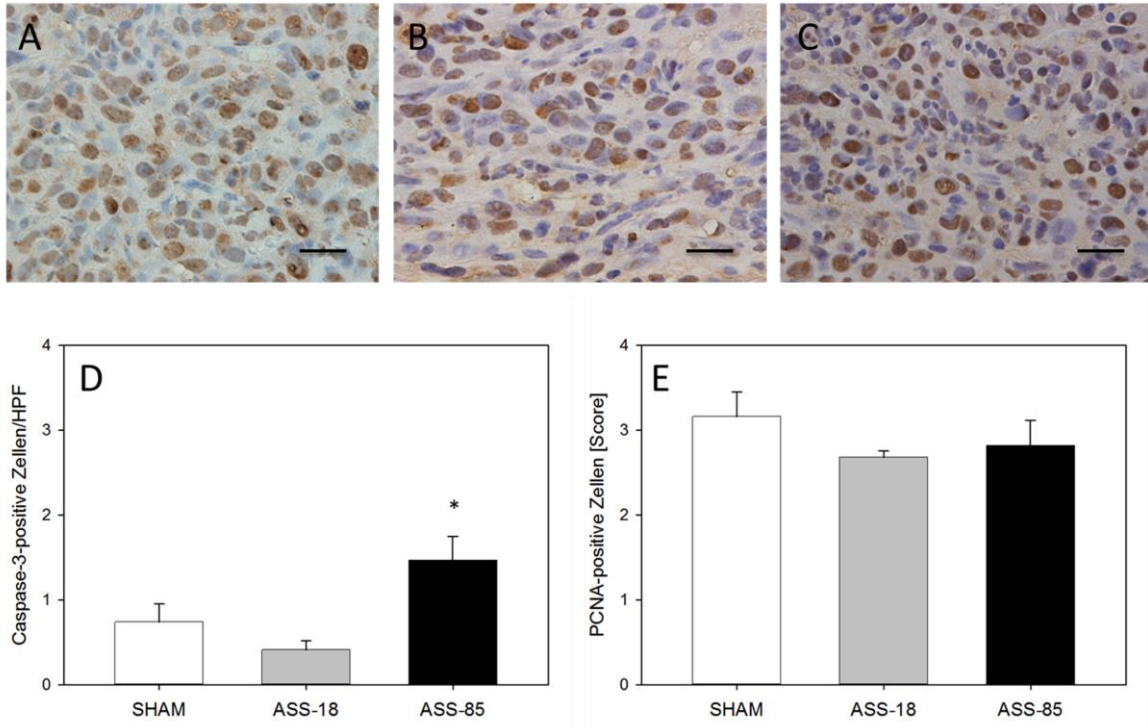


Abbildung 24: Repräsentative Aufnahmen der PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe an Tag 14 nach Tumorzellimplantation. Sham-Behandlung (A) bzw. tägliche Behandlung mit 18mg/kg (B, ASS-18) oder 85mg/kg (C, ASS-85) Acetylsalicylsäure, Maßstab=16µm. D und E: Analyse der Tumorzellapoptose (D, Caspase-3-positiv Zellen/HPF) sowie der Tumorzellproliferation (E, PCNA-positiv Zellen als semiquantitativer Score) unter Behandlung mit ASS-18 (grauer Balken) oder ASS-85 (schwarzer Balken) im Vergleich zur Sham-behandelten Kontrollgruppe (weißer Balken). Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben. \* $p < 0,05$  versus ASS-18.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion des tierexperimentellen Versuchsmodells

Das Modell der Rückenhautkammer erlaubt uns nach Implantation von Zellen, Gewebetransplantaten oder Biomaterialien die wiederholte nicht invasive, mehrtägige bis zweiwöchige Beurteilung und Dokumentation des Wachstumsprozesses an der narkotisierten Maus sowie eine spätere Quantifizierung der Messparameter mit Hilfe eines Computer-gestützten Bildverarbeitungsprogrammes [Laschke et al., 2011, Menger et al., 2002]. Durch dieses Versuchsmodell lassen sich im Fall unserer Studie Aussagen über die Tumervaskularisierung und über das Tumorflächenwachstum treffen. Die von uns durchgeführte Implantation syngener GFP-transfizierter CT-26.WT Kolonkarzinomzellen ist ein etabliertes Modell und wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen angewandt [Kollmar et al., 2007]. Der Versuchsablauf ist bei jedem einzelnen Versuchstier gut reproduzierbar. Die Aussagekraft eines in-vitro Experiments ist im Vergleich zum Tierexperiment deutlich geringer und nur bedingt auf den menschlichen Organismus übertragbar.

Die Dosierungen der Pharmaka wurden anhand bereits durchgeführter Studien bestimmt. Die Dosis von ENOXA-6 wurde entsprechend einer Studie von Li et al. gewählt, die für eine Dosis von 4-8mg/kg Enoxaparin-Natrium im Mausmodell eine gute Verträglichkeit erzielen konnte [Li et al., 2009]. Durch die 2x tägliche Applikation von 6mg/kg Enoxaparin-Natrium (ENOXA-12) sollte untersucht werden, ob eine Verdopplung der Dosis auch eine stärkere Wirkung hervorrufen kann. Die Dosierung von FONDA-1,25 stammt aus einem Mausmodell von Xu et al. aus dem Jahr 2006 [Xu et al., 2006]. Die Dosierung von TINZA-10 wurde aus einem Mausmodell mit Melanomzellen abgeleitet, in dem für die genannte Dosis eine Metastasierungshemmung nachgewiesen werden konnte [Amirkhosravi et al., 2003]. Durch Verdopplung der Tinzaparin-Natrium-Dosierung sollte auch hier analog zur Dosierung von Enoxaparin-Natrium untersucht werden, ob eine höhere Dosis eine Steigerung der Wirkung hervorrufen kann. Als Orientierung für die Festlegung der Dosis der Acetylsalicylsäure diente eine Studie von Javeed et al., die durch eine Applikation von 60mg/kg Acetylsalicylsäure im Balb-c Mausmodell eine positive Wirkung ausmachen konnte [Javeed et al., 2011].

Um Störfaktoren zu minimieren, wurden die Tiere randomisiert zu den einzelnen Versuchsgruppen zugeordnet. Alle Operationen, Implantationen und Untersuchungen wurden von einer Person durchgeführt. Um den Fehler einer subjektiven Beeinflussung der Ergebnisse zu relativieren, wurden die Ergebnisse verblindet ausgewertet. Nachteilig am vorliegenden

Versuchsmodell ist die fehlende Möglichkeit zur Bestimmung der gesamten Tumorzellmasse. Zudem kann auch die Vaskularisierung in unserem Modell nur näherungsweise bestimmt werden, da die IVM nur eine Analyse der oberflächlichen Tumorschichten erlaubt. Dennoch stellt die Rückenhautkammer im Vergleich zu anderen Versuchsmodellen den bestmöglichen Kompromiss für eine repetitive in-vivo Analyse dar.

## **5.2 Enoxaparin-Natrium und Tumorwachstum**

Die Applikation von ENOXA-6 und ENOXA-12 hat in unserem Versuchsmodell keinen Einfluss auf die Tumorzellproliferation, die Tumorzellapoptose und das Tumorwachstum der GFP-transfizierten CT26.WT Tumorzellen. Im Gegensatz zu den von uns beobachteten Ergebnissen wird den NMH in der Literatur jedoch eine Hemmung der Zellproliferation und des Tumorwachstums sowie eine Induktion der Apoptose zugeschrieben. Als Ursache für die antitumoröse Wirkung der NMH werden verschiedene Ansätze diskutiert. Es wird vermutet, dass die NMH über eine Hemmung der TF-Sekretion sowie über eine Induktion der TFPI-Ausschüttung die Tumorzellproliferation, die Apoptose und schließlich das Tumorwachstum beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur der TF sondern auch der TFPI im Rahmen des Tumor-induzierten hyperkoagulativen Stadiums die Tumorzellproliferation, die Tumorzellapoptose und auch das Tumorwachstum beeinflussen. In einem in-vitro Versuch an HCT116 Kolonkarzinomzellen konnte nachgewiesen werden, dass durch eine Reduktion der TF-Expression das Tumorwachstum gehemmt werden kann [Versteeg et al., 2008, Yu et al., 2005]. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch durch Einsatz eines rekombinanten TFPI beobachtet werden [Tieken et al., 2016, Versteeg et al., 2013].

Als Ursache für die TFPI- sowie TF-vermittelte Wirkung der NMH auf die Tumorzellproliferation, die Tumorzellapoptose und das Tumorwachstum wird eine Hemmung der PAR-induzierten Signaltransduktion vermutet. Die PARs sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die in den Zellen der Kapillarwand sowie in Thrombozyten und Leukozyten exprimiert werden. Sie führen Extracellulär-Signal-Regulated Kinase-1- und -2- (ERK-1 und -2), Calcium- sowie Protein Kinase  $\alpha$ -vermittelt zu einer Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Lipiden und beeinflussen somit die Zellproliferation, die Apoptose und die Zellmigration. Als direkte Aktivatoren der PAR spielen Thrombin, der TF-FVIIa- sowie der TF-FVIIa-Xa-Komplex eine bedeutsame Rolle. Thrombin und der TF-FVII-FXa-Komplex führen zu einer Aktivierung des Protease-activated-Rezeptor 1 (PAR-1). Der TF-

FVIIa-Komplex sowie der TF-FVIIa-FXa-Komplex aktivieren vor allem den Protease-activated-Rezeptor 2 (PAR-2). Dieser wird hauptsächlich in kolorektalen Karzinomen exprimiert. Hu et al. bestätigten in einem in-vitro Versuch an SW620 Kolonkarzinomzellen, dass der TF-FVIIa-Komplex PAR-2-vermittelt zu einer Induktion der Zellproliferation von SW620 Kolonkarzinomzellen führt [Hu et al., 2013]. In einer Studie von Darmoul et al. an HT29 Kolonkarzinomzellen konnte zudem nachgewiesen werden, dass eine Thrombin-induzierte Stimulation des PAR-1 in-vitro ein vermehrtes Tumorwachstum hervorruft [Darmoul et al., 2003]. Es wird angenommen, dass die NMH durch Reduktion der TF-Sekretion zu einer Hemmung der TF-FVIIa-sowie TF-FVII-FXa-Komplex-vermittelten Signaltransduktion führen können. Die TFPI-vermittelte Wirkung der NMH wird durch eine Komplexbildung des TFPI mit dem TF-FVIIa-Komplex hervorgerufen. Die Bildung des TFPI-TF-FVIIa-Komplexes führt somit sowohl direkt als auch indirekt durch eine Reduktion der Thrombinbildung zur Hemmung der PAR-vermittelten Signaltransduktion und dadurch zur Hemmung der Tumorzellproliferation und des Tumorwachstums.

Eine in-vitro Studie von Carmazzi et al. konnte diese vermutete antiproliferative Wirkung der NMH bestätigen. Für die Applikation des NMH Nadroparin mit einem Molekulargewicht von ca. 4,5kDa konnte ein Zellzyklusarrest in Lungenkarzinomzellen nachgewiesen werden [Carmazzi et al., 2012]. Demgegenüber steht eine Studie von Berezcky et al. [2005], die analog zu unseren Ergebnissen für das NMH Dalteparin-Natrium weder eine Proliferationshemmung noch eine Wachstumshemmung von Melanomzellen nachweisen konnte.

In der bereits diskutierten Studie von Carmazzi et al. konnte durch die Applikation des NMH Nadroparin, wie auch in unserer Studie, keine Induktion der Apoptose beobachtet werden. Allerdings gibt es Studien, die Anlass geben zu vermuten, dass die NMH die Apoptose induzieren. Manaster et al. zeigten in ihren Arbeiten, dass Heparine in humanen neutrophilen Granulozyten zu einer Induktion der Apoptose führen [Manaster et al., 1996]. Als Ursache wird ebenfalls eine Hemmung der PAR-2-vermittelten Signaltransduktion vermutet. Shanshan et al. konnten in ihrer Studie an Zervixkarzinomzellen nachweisen, dass eine direkte Hemmung des PAR-2 neben einer Hemmung der Zellproliferation auch eine Induktion der Apoptose bewirkt [Shanshan et al., 2019].

Entgegen den bereits diskutierten Studien konnten wir in unserem Experiment keine Enoxaparin-Natrium-vermittelte Wirkung auf die Zellproliferation bzw. Tumorzellapoptose nachweisen. Die genannten Erkenntnisse der Literatur sind kritisch zu diskutieren. Sie bieten mögliche Erklärungsansätze für die bisher beobachteten Wirkungen der NMH. Es ist jedoch fraglich, ob die TFPI-Induktion bzw. die Hemmung der TF-Sekretion durch die NMH

ausreichend ist, um die PAR-vermittelte Signaltransduktion zu drosseln und dadurch die Zellproliferation, die Tumorzellapoptose und schlussendlich das Tumorwachstum zu beeinflussen. Betrachtet man die Studie von Mousa et al., dann lässt sich die fehlende Wirkung in unserer Studie möglicherweise durch die geringe Molekülmasse von Enoxaparin-Natrium erklären. Mousa et al. zeigten, dass erst ab einer Molekülmasse >2kDa mit einer Ausschüttung des TFPI gerechnet werden kann [Mousa et al., 2003, Mousa et al., 2013]. Eine maximale TFPI-Ausschüttung konnte erst für ein Molekulargewicht von 8-12kDa detektiert werden [Mousa et al., 2004, Norrby, 2006]. Daher ist davon auszugehen, dass das Molekulargewicht von Enoxaparin-Natrium nicht ausreicht, um eine PAR-vermittelte Hemmung der Zellproliferation oder eine Induktion der Apoptose zu bewirken. Die Hemmung der Zellproliferation konnte bisher größtenteils nur durch potentere Agenzien, chemisch modifizierte Heparine sowie extrem hohe Dosierungen erreicht werden. Zudem stammen die meisten der positiven Ergebnisse und Erklärungsansätze der Literatur aus in-vitro Versuchen, die mit unserem Versuchsprotokoll nur bedingt verglichen werden können.

Als weitere Ursache für die antitumoröse Wirkung der NMH wird eine Inaktivierung der Heparanase sowie der P-Selektine verantwortlich gemacht. Die Heparanase ist eine Endoglycosidase, die durch Spaltung von Heparansulfat-Ketten und Heparansulfat-Proteoglycanen die extrazelluläre Matrix degradieren kann. So wird den Tumorzellen eine Migration ins umgebende Gewebe erleichtert. Die Heparanase ruft zudem eine vermehrte Ausschüttung des TF hervor und führt durch eine Komplexbildung mit dem TFPI zu dessen Inaktivierung [Mousa et al., 2009, Nadir et al., 2014]. Bar-Ner et al. konnten in ihrer Studie für non-anticoagulant Heparine mit einem Molekulargewicht von 4,5kDa eine Hemmung der Heparanase-Aktivität nachweisen [Bar-Ner et al., 1987]. Die direkte Auswirkung auf das Tumorwachstum wurde nicht untersucht.

Die Heparin-vermittelte Hemmung der P-Selektine führt zu einer Reduktion der Zell-Zell-Interaktion zwischen Thrombozyten, Leukozyten und Tumorzellen. Die Tumorzelle kann so besser durch die körpereigene Immunzelle erkannt und destruiert werden [Alyahya et al., 2015]. Des Weiteren ermöglichen die P-Selektine eine Migration von Leukozyten in das umliegende Gewebe. Es wird vermutet, dass auch die Tumorzelle diesen Mechanismus zur Migration ins Gewebe nutzt [Borsig et al., 2001, Garcia et al., 2007, Mousa et al., 2009, Stevenson et al., 2005, Wei et al., 2004]. Eine Hemmung der P-Selektine führt zudem zu einer Downregulation der TF-Ausschüttung. Stevenson et al. [2005] konnten in ihrer Studie mit Kolonkarzinom- und Melanomzellen für klinisch relevante Enoxaparin-Natrium-Dosierungen jedoch nur eine schwache Hemmung der P-Selektine nachweisen. Das primäre

Tumorwachstum bzw. die Zellproliferation wurden in dieser Arbeit nicht untersucht [Stevenson et al., 2005].

Entsprechend einer in-vitro Studie von Takahashi et al. ist zudem davon auszugehen, dass eine Beeinflussung des Tumorwachstums auch durch eine Hemmung der Angiogenese hervorgerufen werden kann [Takahashi, 2005]. Diese Annahme basiert auf der These von Folkman et al., die zeigten, dass Tumore ab einer Größe von 2-3mm<sup>2</sup> zum weiteren Wachstum eine suffiziente Gefäßversorgung benötigen [Folkman, 1971]. Takahashi et al. bestätigten in ihrer Studie, dass NMH über eine Hemmung der Angiogenese zur Hemmung des Tumorwachstums führen. Die Zellproliferation konnte wie auch in unserer Studie nicht beeinflusst werden [Takahashi et al., 2005]. So lässt sich die ausbleibende Wachstumshemmung in der vorliegenden Untersuchung nach Folkman et al. [1971] und Takahashi et al. [2005] auch durch die nicht signifikante Hemmung der Angiogenese erklären, sodass eine suffiziente Nährstoffversorgung der Tumorzellen gewährleistet bleibt.

Betrachtet man nun abschließend die Studien, die die primäre Wirkung der Heparine auf Tumore untersuchen, so fällt auf, dass diese eher eine Wirkung der NMH auf die Angiogenese und die Tumorzellmigration als auf die primäre Tumorzellproliferation und das Tumorwachstum beschreiben. Es gibt vergleichbare Studien, die ihren Fokus hauptsächlich auf die Tumorangiogenese legten und das primäre Tumorwachstum völlig außer Acht ließen [Debergh et al., 2015]. Die bisher publizierten Studien zur primären Auswirkung der Heparine auf das Tumorwachstum subkutan implantierter Tumore im Tiermodell untermauern jedoch unsere Ergebnisse. In einer Studie von Niers et al. konnten nur bei 11 von 24 Studien durch die Applikation von teils chemisch modifizierten Heparinen oder sehr hohen Dosierungen eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums ab einer Behandlungsdauer >15 Tagen erzielt werden [Niers et al., 2007]. Für NMH konnte analog zu unseren Ergebnissen keine Hemmung des Tumorwachstums nachgewiesen werden. Lediglich Pross et al. zeigten in einer Studie an WAG-Ratten, dass durch eine intraperitoneale sowie eine gleichzeitige subkutane Applikation des NMH Reviparin die Tumormasse von intraperitonealen CC531 Kolonkarzinomzellen reduziert werden konnte [Pross et al., 2003]. Vergleicht man das verwendete Protokoll mit unserer Studie, so ist davon auszugehen, dass die erhöhte lokale Konzentration des NMH für die positive Wirkung verantwortlich ist. So bleibt weiter fraglich, ob klinisch relevante Dosierungen einen Einfluss auf das Tumorwachstum hervorrufen können.

### 5.3 Enoxaparin-Natrium und Tumorangiogenese

Wir konnten in unserem Versuchsmodell durch eine Applikation von ENOXA-6 und ENOXA-12 in der IVM keine signifikante Reduktion der Kapillardichte nachweisen. Zudem lässt sich feststellen, dass die Dosis von 2x6mg/kg im Vergleich zur Dosis von 1x6mg/kg keine deutlichen Vorteile zeigt. Diese Beobachtung deckt sich mit einer Studie von Khorana et al., die bei einer Steigerung der Heparin-Dosis ebenfalls keine steigende antiangiogene Wirkung demonstrieren konnte [Khorana et al., 2003]. Es wird postuliert, dass eine adäquate antikoagulative Dosis nicht unbedingt eine adäquate Hemmung der Angiogenese hervorrufen muss.

In der Literatur wird den Heparinen jedoch im Gegensatz zu unseren Beobachtungen eine antiangiogene Wirkung zugeschrieben. Khorana et al. zeigten bereits 2003 in ihrem Matrigel-Assay, dass Enoxaparin-Natrium zu einer signifikanten Reduktion der Angiogenese führt [Khorana, 2003]. Dogan et al. konnten dies 2011 in einem „chick embryo chorioallantoic membrane model“ bestätigen [Dogan et al., 2011]. Khorana et al. zeigten zudem, dass die Wirkung der Heparine von ihrem Molekulargewicht sowie von der Anzahl der Polysaccharidketten abhängig ist. Sie konnten für ein Molekulargewicht von 6kDa und eine Kettenlänge >8 Polysaccharidketten eine maximale Hemmung der Endothelzellproliferation nachweisen [Khorana, 2003].

Als Ursache für die antiangiogene Wirkung der NMH werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Es wird angenommen (s. 5.2), dass die NMH durch eine Hemmung der TF-Sekretion sowie durch eine Induktion der TFPI-Ausschüttung nicht nur die Zellproliferation, das Tumorstadium und die Tumorzellapoptose, sondern auch die Tumorangiogenese beeinflussen.

Die Überexpression des TF im Rahmen des hyperkoagulativen Stadiums führt zu einer gesteigerten Produktion von VEGF und bFGF durch die Tumorzellen. In Kolonkarzinomzellen wird eine Mutation des KRAS sowie des p53-Tumorsuppressorgens für diese erhöhte TF-Expression verantwortlich gemacht [Yu et al., 2005].

Des Weiteren wird vermutet, dass es im Rahmen der Angiogenese-Induktion TF-vermittelt durch Bildung von TF-FVIIa- sowie TF-FVIIa-Xa-Komplexen zu einer Aktivierung der PAR kommt. Dies führt zu einer vermehrten Ausschüttung von VEGF, bFGF, dem an der Angiogenese und Entstehung von Tumoren beteiligten Zytokin CXCL-1 sowie IL-8 [Liu et al., 2006, Ticken et al., 2016]. Gestützt wird diese These durch eine Studie von Liu et al.. Sie

zeigten an humanen Mammakarzinomzellen, dass eine direkte Aktivierung des PAR-2 durch Agonisten zu einer vermehrten Expression von VEGF führt. Durch einen PAR-1-Agonisten hingegen konnte nur ein geringer Effekt beobachtet werden, sodass eine vor allem PAR-2-vermittelte Aktivierung der Angiogenese angenommen wird [Liu et al., 2006]. Auch Versteeg et al. zeigten eine signifikante Reduktion PECAM-1-positiver Zellen/HPF durch gezielte Hemmung des PAR-2 mit einem TF-Antikörper [Versteeg et al., 2008].

Eine Unterform des TFPI, der TFPI-2 besitzt zudem die Fähigkeit, die Plasmin- und Trypsin-vermittelte Aktivierung der PAR zu blockieren. Trypsin spielt als Aktivator der PAR-2 vor allem bei kolorektalen Karzinomen eine wichtige Rolle. Liu et al. wiesen nach, dass die Trypsin-vermittelte Aktivierung des PAR-2 zu einer vermehrten VEGF-Produktion führt [Liu et al., 2006].

Des Weiteren hemmt der TFPI in einem TF-unabhängigen Weg mit seinem Carboxy-Terminus die Aktivierung des VEGF-2-Rezeptors. Dies führt zu einer verminderten VEGF-Ausschüttung und zu einer Hemmung der Endothelzellmigration [Holroyd et al., 2012].

Es existiert zudem eine Isoform des TF, der as-TF, der zu einer direkten Integrin-vermittelten Aktivierung der Endothelzellen führt und damit die Angiogenese beeinflusst.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Wirkung der NMH geht von einer Hemmung der Bindung der Wachstumsfaktoren an der Zelloberfläche aus. VEGF und bFGF binden an Heparan-Sulfat-Proteoglykane der Endothelzellen sowie der extrazellulären Matrix und induzieren die Angiogenese. Dieses Phänomen ist abhängig von der Anzahl der Polysaccharidketten und der Zusammensetzung der jeweiligen Substanzen. Soker et al. konnten nachweisen, dass Heparinfragmente mit einer Saccharidlänge von 16-18 Saccharideinheiten die Bindung von VEGF<sub>165</sub> am VEGF-Rezeptor hemmen [Soker et al., 1994].

Die Mehrzahl der hier beschriebenen Ergebnisse der Literatur stammt aus in-vitro Versuchen oder untersucht die Wirkung potenterer Agenzien auf die Tumorangiogenese. Eine vergleichbare Studie von Debergh et al. aus 2010 konnte für die Applikation von Nadroparin in einem Rückenhautkammermodell des Hamsters im Einklang mit unseren Beobachtungen für die Kapillardichte in cm/cm<sup>2</sup> ebenfalls keine signifikanten Veränderungen nachweisen [Debergh et al., 2010]. In einer 2015 durchgeführten Studie an einem kolorektalen Xenograftmodell an Mäusen konnten sie jedoch durch eine Behandlung mit Enoxaparin-Natrium eine signifikante Reduktion der Kapillardichte in cm/cm<sup>2</sup> nachweisen [Debergh et al., 2015]. Vergleicht man unsere Ergebnisse mit dieser Studie von Debergh et al., so lassen sich die Unterschiede durch die fast 7-fach höhere Dosierung pro kg Körpergewicht in der Studie



von Debergh et al. [2015] im Vergleich zu unserer Studie, die verschiedenen Mausspezies, die Tumorzelllinien und die verschiedenen Analysezeitpunkte erklären. Die in dem Versuch von Debergh et al. [2015] pro kg KG verabreichte Dosis lässt sich auf den klinischen Alltag nur schwer übertragen, da sie die empfohlene Tagesdosis deutlich überschreitet, sodass die Blutungskomplikationen die mögliche antiangiogene Wirkung überschatten würden. Unabhängig von der von Debergh et al. [2015] durchgeführten Untersuchung lässt sich die fehlende Wirkung von Enoxaparin-Natrium entsprechend den oben diskutierten Signalkaskaden durch die insuffiziente TFPI-Induktion sowie die unzureichende Hemmung der TF-Sekretion bedingt durch die geringe Molekülmasse von Enoxaparin-Natrium (4,5kDa) erklären [Mousa et al., 2004]. Die in der Literatur beschriebene antiangiogene Wirkung von Enoxaparin-Natrium sollte weiterhin kritisch diskutiert werden, da eine Vielzahl der Untersuchungen als in-vitro Experimente durchgeführt wurden und damit nur bedingt auf in-vivo Bedingungen und humane Karzinome übertragbar sind.

#### **5.4 Fondaparinux und Tumorwachstum**

Fondaparinux ist als direkter Faktor Xa-Inhibitor für die Prophylaxe venöser Thrombembolien zugelassen und zeigt in einer Studie von Yamaoka et al. nach abdominaler Resektion von kolorektalen Karzinomen bei niedrigem Nebenwirkungsprofil sehr gute Ergebnisse in der Prophylaxe venöser Thrombembolien [Yamaoka et al., 2015]. In der vorliegenden Studie wurde die direkte Wirkung von FONDA-1,25 auf kolorektale CT-26.WT Karzinomzellen untersucht. Zur Auswirkung von Fondaparinux auf Karzinome sowie deren Zellproliferation und Angiogenese existieren in der Literatur bisher nur wenige Untersuchungen. Die ersten Untersuchungen zur Auswirkung von Fondaparinux auf die Zellproliferation wurden in einem in-vitro Modell mit humanen Osteoblasten durchgeführt. Hierbei konnte für Fondaparinux im Vergleich zu Dalteparin keine Proliferationshemmung nachgewiesen werden [Handschin et al., 2005]. Eine vergleichbare Studie von Papathanasopoulos et al. zur Auswirkung von Fondaparinux auf die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen zeigte entsprechend unseren Beobachtungen ebenfalls keine Wirkung [Papathanasopoulos et al., 2011]. Da Pozzo et al. konnten in einem HUVEC-Modell ebenfalls keine signifikante Hemmung der Zellproliferation durch die Applikation von 2,5mg/kg Fondaparinux erreichen [Da Pozzo et al., 2012]. Auch ein Versuchsmodell mit Lungenkarzinomzellen konnte für Fondaparinux keinen signifikanten Effekt nachweisen. Diese Ergebnisse der Literatur decken sich mit der von uns beobachteten fehlenden Wirkung von FONDA-1,25 auf die Tumorzellproliferation GFP-

transfizierter CT26.WT Kolonkarzinomzellen. Ein Erklärungsansatz bietet eine Studie an Kolonkarzinom- und Melanomzellen von Stevenson et al.. Sie zeigten, dass durch Fondaparinux keine Hemmung der Selektine hervorgerufen werden kann [Stevenson et al., 2005]. Ursächlich für die fehlende Wirkung auf die Tumorzellproliferation und die Tumorzellapoptose kann entsprechend Mousa et al. 2013 zudem auch das geringe Molekulargewicht von 1,728 kDa sein, da für ein Molekulargewicht kleiner als 2kDa nur eine geringe Ausschüttung des TFPI erreicht werden kann [Mousa et al., 2003, Mousa et al., 2013]. Durch insuffiziente TFPI-Ausschüttung bleibt möglicherweise eine PAR-vermittelte Hemmung der Tumorzellproliferation sowie der Tumorzellapoptose aus. Diese These wird durch eine weitere Studie von Mousa et al. bestätigt, die für das Pentasaccharid Fondaparinux in ihrem HUVEC-Modell keine TFPI-Ausschüttung nachweisen konnten [Mousa et al., 2004].

Des Weiteren lässt sich die fehlende Hemmung des Tumorwachstums wie bereits unter 5.2. diskutiert entsprechend Folkman et al. [1971] und Takahashi et al. [2005] durch eine unzureichende Angiogenesehemmung und eine dadurch erhaltene Nährstoffversorgung des Tumors erklären.

## **5.5 Fondaparinux und Tumorangiogenese**

In der vorliegenden Studie konnte für die Applikation von FONDA-1,25 in der IVM eine geringere Kapillardichte im gesamten Tumor im Vergleich zur Kontrollgruppe für den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen gemessen werden. Aufgrund der hohen Standardabweichung konnte jedoch nur am Beobachtungstag 11 eine Signifikanz erreicht werden. Zudem konnte für die PECAM-1-Färbung als Marker der Angiogenese analog zur IVM eine verminderte Anzahl PECAM-1-positiver Zellen durch eine Behandlung mit FONDA-1,25 gemessen werden. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen steht eine Studie von Khorana et al. [2003], die für Fondaparinux mit einem Molekulargewicht von 1,728kDa im HUVEC-Modell und Matrigel-Assay keine Wirkung auf die Angiogenese nachweisen konnten. Ein Erklärungsansatz bietet, wie bereits diskutiert, die insuffiziente TFPI-Freisetzung sowie die insuffiziente Hemmung der TF-Sekretion aufgrund des geringen Molekulargewichts von Fondaparinux. Khorana et al. [2003] konnten nur für Substanzen mit höherem Molekulargewicht eine signifikante Hemmung der Angiogenese erzielen. Analog zu unseren Ergebnissen existiert in der Literatur die bereits oben genannte Studie von Da Pozzo et al., die bei fehlender Proliferationshemmung lediglich eine minimale Hemmung der Angiogenese

feststellen konnte [Da Pozzo et al., 2012]. Eine mögliche Erklärung für die von uns beobachtete signifikante Hemmung der Angiogenese am Beobachtungstag 11 liefert eine Studie von Battinelli et al. an MCF-7 Tumorzellen. Neben der PAR-2-vermittelten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren spielt entgegen der Annahme von Liu et al. auch eine PAR-1-abhängige Aktivierung der Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Angiogenese-Induktion. Im Rahmen des hyperkoagulativen Stadiums kommt es durch eine gesteigerte Produktion von Thrombin zur Aktivierung des PAR-1 der Thrombozyten und dadurch zur vermehrten Freisetzung des VEGF. Battinelli et al. [2014] zeigten in ihrem in-vitro Experiment, dass das NMH Fondaparinux diese Thrombozytenaktivierung hemmt und so zu einer signifikanten Hemmung der VEGF-Spiegel führt [Battinelli et al., 2014]. Somit kommt es möglicherweise in einem TFPI-unabhängigen pathway durch eine verminderte Ausschüttung von VEGF durch die Thrombozyten zu einer Hemmung der Angiogenese.

## **5.6 Tinzaparin-Natrium und Tumorwachstum**

Eine tägliche Applikation von TINZA-10 bzw. TINZA-20 hatte über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen keinen Einfluss auf das Tumorwachstum und die Apoptoseinduktion. Für die Zellproliferation konnte in der vorliegenden Studie eine signifikante Reduktion der PCNA-positiven Zellen am Beobachtungstag 14 im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden. Vergleicht man unsere Ergebnisse mit den vorliegenden Studien der Literatur, so fällt auf, dass in der Literatur bisher keine Voruntersuchungen zur Auswirkung von Tinzaparin-Natrium auf die Tumorzellproliferation existieren. Lediglich eine Studie an mesenchymalen Stammzellen konnte analog zu unseren Ergebnissen eine Hemmung der Zellproliferation durch Tinzaparin-Natrium nachweisen [Papathanasopoulos et al., 2011]. Ein Erklärungsansatz für die von uns beobachtete signifikante Reduktion der Zellproliferation am Tag 14 bietet die bereits diskutierte Studie von Mousa et al., die zeigte, dass Tinzaparin-Natrium zu einer vermehrten Freisetzung des TFPI führt und dadurch eine Hemmung des TF-FVIIa-Komplexes bedingt [Mousa et al., 2004]. Allerdings war nicht die Auswirkung auf das Tumorwachstum, sondern die Auswirkung auf die Angiogenese der primäre Endpunkt der Untersuchung. Dennoch kann entsprechend der Ergebnisse von früheren Studien für ein mittleres Molekulargewicht von 6,5kDa angenommen werden, dass die Hemmung des TF-FVIIa-Komplexes nicht nur zu einer Hemmung der Angiogenese, sondern auch zu einer Hemmung der PAR-vermittelten Stimulation der Zellproliferation führt (s. 5.2.). Analog zu Darmoul et al. [2003] kann die von uns beobachtete Proliferationshemmung am

Beobachtungstag 14 auch durch eine verminderte Thrombinbildung und eine dadurch bedingte Hemmung der PAR-1-vermittelten Signaltransduktion zurückgeführt werden.

Des Weiteren wird in der Literatur eine Wirkung der Heparine auf den an der Zellproliferation beteiligten insulin like growth factor (IGF) postuliert. Andress konnte in seiner Studie an Osteoblasten durch die Applikation von Heparinen eine IGF-vermittelte Suppression des Zellwachstums nachweisen [Andress, 1995].

Stevenson et al. zeigten zudem, dass eine Applikation von Tinzaparin-Natrium zu einer Steigerung der Selektinblockade und damit, durch Hemmung der P- und L-Selektin-vermittelten Zellmigration, zu einer signifikanten Reduktion der Metastasierung von humanen Kolonkarzinom- und Melanomzellen führt [Stevenson et al., 2005]. So kann angenommen werden, dass auch eine Selektin-vermittelte Reduktion des TF erreicht werden kann (s. 5.2.). Der genaue Wirkmechanismus bleibt jedoch unklar und sollte in weiteren Studien untersucht werden, um eine klinische Bedeutung zu evaluieren. Trotz einer signifikanten Hemmung der Tumorzellproliferation konnten wir jedoch keine Hemmung des Tumorwachstums im Beobachtungszeitraum von 14 Tagen nachweisen. Betrachtet man die vorausgehenden Studien zur Auswirkung der Heparine auf das Tumorwachstum, so decken sich diese größtenteils mit unseren Ergebnissen. Erst für eine Beobachtungsdauer >15 Tagen konnte eine Hemmung des Tumorwachstums erzielt werden [Niers et al., 2007]. Es ist zu bedenken, dass es sich hierbei jedoch auch um modifizierte Substanzen handelt. So bleibt die Frage offen, ob in unserer Studie bei signifikanter Proliferationshemmung im weiteren Verlauf eine Hemmung des Tumorwachstums hätte erreicht werden können.

Die fehlende Suppression des Tumorwachstums lässt sich möglicherweise auch auf eine fehlende Hemmung der Tumorzellapoptose zurückführen. Dies hebt entgegen der Studie von Carmazzi et al. die Bedeutung der Tumorzellapoptose für die Hemmung des Tumorwachstums hervor [Carmazzi et al., 2012]. Zur Auswirkung von Tinzaparin-Natrium auf die Tumorzellapoptose existieren bisher keine vergleichbaren Publikationen in der Literatur.

Neben der fehlenden Apoptosehemmung ist möglicherweise auch die unzureichende Hemmung der Angiogenese ursächlich für die fehlende Hemmung des Tumorwachstums [Takahashi et al., 2005].

## 5.7 Tinzaparin-Natrium und Tumorangiogenese

Eine Applikation von TINZA-10 bzw. TINZA-20 über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen führte zu einer deutlichen Reduktion der Kapillardichte im Tumorrand und im Tumorzentrum. Für TINZA-10 konnte am Beobachtungstag 11 eine signifikante Reduktion der Kapillardichte erzielt werden. Eine Dosiserhöhung auf TINZA-20 zeigte keine Wirkungssteigerung. Eine Erklärung für die fehlende Wirkungssteigerung mit zunehmender Dosis liefert die Literatur nicht. Unsere Ergebnisse decken sich jedoch mit den Beobachtungen von Khorana et al., die bei einer Dosissteigerung der Heparine ebenfalls keine Zunahme der Wirkung detektieren konnten [Khorana et al., 2003]. So wird in der vorliegenden Studie für die höhere Dosis sogar eine verminderte Wirkung beobachtet. Zudem konnte kein Einfluss auf die Anzahl PECAM-1-positiver Zellen beobachtet werden.

Erste Beobachtungen zur antiangiogenen Wirkung von Tinzaparin-Natrium machten Khorana et al. 2003 in einem Matrigel-Assay [Khorana et al., 2003]. Diese These bestätigten Dogan et al., die in einem CAM-Assay ebenfalls die antiangiogene Wirkung von Tinzaparin-Natrium detektieren konnten [Dogan et al., 2011]. Mousa et al. bewiesen zudem 2004, dass Tinzaparin-Natrium durch eine Stimulation der TFPI-Ausschüttung zu einer Hemmung der TF/FVIIa-Komplex-vermittelten Gefäßneubildung führt. Diese Hemmung konnte durch den Einsatz eines TFPI-Antikörper vollständig aufgehoben werden [Mousa et al., 2004b]. Zudem konnte hierbei, analog zur Studie von Khorana et al., gezeigt werden, dass die Wirkung vom Molekulargewicht der Heparine abhängig ist. Für Heparin-Fragmente mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 12kDa konnte die effektivste TFPI-Ausschüttung erzielt werden [Mousa et al., 2004]. In anderen Versuchen der Arbeitsgruppe konnte wie von Khorana et al. für ein Molekulargewicht zwischen 6-8kDa die maximale TFPI-Sekretion erreicht werden. Dies erklärt die teils signifikante Hemmung der Angiogenese in der vorliegenden Studie. Bei einem Molekulargewicht von 6,5kDa kann entsprechend den früheren Studien von einer ausreichenden TFPI-Freisetzung ausgegangen werden. Es sollte hierbei jedoch bedacht werden, dass diese Ergebnisse aus in-vitro Versuchen stammen und die antiangiogene Wirkung der Substanzen nicht an Karzinomzellen nachgewiesen wurde. Untersuchungen zur direkten Auswirkung von Tinzaparin-Natrium auf die Tumorangiogenese existieren bisher nicht. In der vorliegenden Studie konnte für den Beobachtungstag 14 im Vergleich zum Beobachtungstag 11 keine Signifikanz nachgewiesen werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass die TFPI-vermittelte Wirkung der NMH nicht ausreicht, um eine signifikante Hemmung der Angiogenese über den gesamten Beobachtungszeitraum aufrechtzuerhalten. Es ist davon

auszugehen, dass eine signifikante Hemmung der Angiogenese für klinisch relevante Tinzaparin-Natrium-Dosierungen möglicherweise nur durch eine Drosselung mehrerer, teils auch TFPI-unabhängiger Signalwege erreicht werden kann.

## **5.8 Acetylsalicylsäure und Tumorwachstum**

Für den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen konnte in der vorliegenden Studie keine Auswirkung von ASS-18 bzw. ASS-85 auf das Tumorflächenwachstum und die Tumorzellproliferation gemessen werden. Für die Tumorzellapoptose konnte, entgegen der bisherigen Beobachtungen bei den NMH am Beobachtungstag 14, für ASS-85 im Vergleich zu ASS-18 eine signifikant höhere Anzahl Caspase-3-positiver Zellen nachgewiesen werden. Zwischen ASS-85 und der Kontrollgruppe ließ sich, trotz deutlich höherer Anzahl an Caspase-3-positiven Zellen/HPF (1,47 vs. 0,74), keine Signifikanz nachweisen.

Als Ursache des antikanzerogenen Potenzials der Acetylsalicylsäure wird neben einer Hemmung der COX-Isoenzyme und der dadurch bedingten Reduktion der PG-E2- sowie TX-A2-Sekretion auch eine COX-unabhängige Wirkung vermutet. Die klinisch relevante Standarddosis der Acetylsalicylsäure von 75-100mg/Tag führt vor allem durch eine Hemmung der COX-1 zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation. Erst für analgetische und anti-inflammatorische Dosen >1000mg/Tag kann für die Acetylsalicylsäure eine Hemmung der COX-2 beobachtet werden [Dovizio et al., 2012]. Es wird postuliert, dass kolorektale Karzinome vor allem die COX-2 exprimieren. Jiang et al. bestätigten in ihrer Studie, dass die von uns verwendeten CT.26WT-Tumorzellen im Gegensatz zu intakten Kolonzellen eine deutlich erhöhte COX-2 Expression aufweisen [Jiang et al., 2015]. Auch Dovizio et al. konnten in ihrer Studie nachweisen, dass die Interaktion zwischen aktivierten Thrombozyten und Tumorzellen zu einer gesteigerten COX-2 Expression in kolorektalen Karzinomen führt [Dovizio et al., 2013]. So ist davon auszugehen, dass eine antikanzerogene Wirkung der Acetylsalicylsäure hauptsächlich durch eine Hemmung der COX-2 hervorgerufen wird. Sheng et al. belegten in ihrer Studie an HCA-7 Kolonkarzinomzellen, dass PG-E2 als Hauptmetabolit der COX-2 zu einer Wachstumssteigerung von Tumorzellen führt. Durch Applikation von selektiven COX-2-Hemmern konnte das PG-E2-induzierte Tumorwachstum reduziert werden [Sheng et al., 1998]. Sample et al. zeigten in ihrer Placebo-kontrollierten Studie, dass die 4-wöchige Applikation von 81mg Acetylsalicylsäure/Tag im Vergleich zur Placebo-Applikation zu einer signifikanten Reduktion der PG-E2-Konzentration in der humanen Rektummukosa führt

[Sample et al., 2002]. Ob diese signifikante PG-E2 Hemmung ausreicht, um eine Hemmung des kolorektalen Adenomwachstums zu bedingen, wird nicht untersucht und bleibt somit weiter offen.

Die Acetylsalicylsäure besitzt zudem die Fähigkeit, die Thrombozyten-Tumorzell-Interaktion zu inhibieren und dadurch das Tumorwachstum zu beeinflussen. Im Rahmen des hyperkoagulativen Stadiums kommt es durch vermehrte Ausschüttung des TF und des CP zur Bildung von Tumorzell-Thrombozyten-Formationen. Diese Interaktion zwischen Thrombozyten und Tumorzellen führt zu einer vermehrten Ausschüttung von PG-E2 und TX-A2 durch die Thrombozyten. Guillem-Llobat et al. wiesen in ihrem Mausmodell an HT29 Kolonkarzinomzellen nach, dass die Acetylsalicylsäure diese Thrombozyten-Tumorzellinteraktion inhibiert und dadurch eine verminderte Ausschüttung von PG-E2 und TX-A2 durch die Thrombozyten bedingt. Sie zeigten, dass die Applikation von 20mg/kg Acetylsalicylsäure durch Hemmung der Thrombozyten-Tumorzellinteraktion neben einer Hemmung der pulmonalen Metastasierung auch zur Reduktion der Migrationsaktivität führt [Guillem-Llobat et al., 2016]. Die Auswirkung der Acetylsalicylsäure auf das primäre Tumorwachstum oder die Tumorzellproliferation wurde nicht untersucht. Es wird zudem postuliert, dass die Tumorzelle durch diese Acetylsalicylsäure-bedingte Hemmung der Thrombozyten-Tumorzellinteraktion für die körpereigene Immunabwehr angreifbarer wird [Bambace et al., 2011, Gay et al., 2011].

Als Ursache für die PG-E2-vermittelte Hemmung der Tumorzellproliferation und des Tumorwachstums werden verschiedene Signalwege diskutiert.

Eine Studie von Sample et al. zeigte, dass PG-E2 zu einer Stimulation der  $\beta$ -catenin/transcription factor (TCF)-abhängigen Transkription von cyclin D1 führt. So wird durch eine Aktivierung der DNA-Synthese die Proliferation und das Wachstum von Kolonkarzinomzellen gesteigert [Sample et al., 2002]. Des Weiteren bedingt der  $\beta$ -catenin/TCF-Signalweg eine vermehrte Expression des VEGF, der dann die Endothelzellproliferation, die Endothelzellmigration und die Bildung eines neuen Gefäßnetzwerks stimuliert [Shao et al., 2005]. Die vermehrte Transkription von cyclin D1 und VEGF bedingt zudem eine EGF-Rezeptor-vermittelte Stimulation der Tumorzellproliferation und der Tumorangiogenese. Pathi et al. konnten im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen zeigen, dass das hoch toxische Natriumsalz der Acetylsalicylsäure über eine Downregulation des Sp-transcription factors und einer dadurch bedingten Reduktion von  $\beta$ -catenin zur Hemmung des Tumorwachstums von kolorektalen Karzinomen in Nacktmäusen beiträgt [Pathi et al., 2012].

Neben der bereits diskutierten COX-2- sowie PG-E2-vermittelten Wirkung der Acetylsalicylsäure auf die Zellproliferation und das Tumorwachstum wird in der Literatur auch die folgende COX-unabhängige Wirkung der Acetylsalicylsäure postuliert.

Die Acetylsalicylsäure besitzt die Fähigkeit, bei einer täglichen Dosis von 600mg durch Hemmung des mTOR und durch Induktion der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), die Zellhomöostase zu beeinflussen und dadurch das Tumorwachstum zu beeinflussen [Din et al., 2012].

Als weiterer Erklärungsansatz für die antiproliferative Wirkung der Acetylsalicylsäure wird eine durch Hemmung des Onkogen c-MYC bedingte Hemmung der Zellproliferation diskutiert. Mitrugno et al. zeigten in ihrer Studie an Kolon- und Pankreaskarzinomzellen, dass die Thrombozyten in einem COX-unabhängigen Signalweg über eine Aktivierung des Onkogens c-MYC zur Stimulation der Tumorzellproliferation führen [Mitrugno et al., 2017]. Sie konnten jedoch analog zu unserer Studie für klinisch vertretbare Acetylsalicylsäuredosen durch Hemmung der Thrombozytenaktivierung keine Wirkung auf die Tumorzellproliferation von SW480 und SW620 Kolonkarzinomzellen nachweisen.

Wir konnten für die tägliche Applikation von ASS-18 bzw. ASS-85 keine Wirkung auf die Tumorzellproliferation und das Tumorwachstum feststellen. Dies lässt sich durch die dosisabhängige Wirkung der Acetylsalicylsäure erklären. Die von uns gewählte Dosis von 18mg/kg entspricht einer humanen Dosis von ca. 100mg täglich, sodass hierfür am ehesten eine Hemmung der COX-1 vermittelten Wirkung erreicht werden kann. Auch die Dosis von 85mg/kg, die einer humanen Dosis von ca. 500mg täglich entspricht und eher eine COX-2 vermittelte Wirkung bedingt, scheint alleine nicht auszureichen, um eine ausreichende Hemmung der PG-E2-Ausschüttung zu erzielen [Reagan-Shaw et al., 2008]. Um eine COX-unabhängige Wirkung zu erreichen, scheint die von uns gewählte Acetylsalicylsäure-Dosis zu gering. In der Literatur konnten erst für Dosierungen >600mg pro Tag Erfolge erzielt werden. Hierbei sollte jedoch bedacht werden, dass mit steigender Dosis auch das Risiko für Blutungskomplikationen steigt, sodass diese extrem hohen Dosierungen auf den klinischen Alltag nicht übertragbar sind.

Neben einer Auswirkung der Acetylsalicylsäure auf die Tumorzellproliferation wird auch eine Auswirkung auf die Tumorzellapoptose postuliert. Sheng et al. [1998] untersuchten zur Bestätigung dieser These die Auswirkung von PG-E2 auf den Zelltod. Die Stimulation von Kolonkarzinomzellen mit PG-E2 führte zu einer Hemmung der Tumorzellapoptose. Auf molekularer Ebene konnte eine erhöhte mitogen-activated protein kinase (MAPK)-



Konzentration sowie eine gesteigerte Bcl-2-Proteinexpression nachgewiesen werden. Die MAPK sind Bestandteile der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und des programmierten Zelltods. Bcl-2 gehört zur Gruppe der B-Zell-Lymphom Proteine und weist eine antiapoptotische Wirkung auf. Sheng et al. konnten abschließend nachweisen, dass selektive COX-2 Inhibitoren durch verminderte PG-E2 Konzentrationen die zuvor diskutierten Prozesse inhibieren und zu einer geringen Steigerung der Tumorzellapoptose führen.

Dies entspricht zum Teil auch unseren Ergebnissen. Wir konnten für die Applikation von ASS-85 im Vergleich zur Applikation von ASS-18 eine signifikant höhere Apoptoserate eruieren. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten wir jedoch keine Wirkung nachweisen, sodass von einer unzureichenden COX-2-Hemmung für die von uns gewählte Dosierung und das gewählte Therapieintervall ausgegangen werden muss. Es sollte jedoch bedacht werden, dass die bisher beobachtete Hemmung der Apoptose in der Literatur nur durch direkte COX-2 Inhibitoren erreicht werden konnte.

Des Weiteren postulierten Nie et al., dass die verminderte Sekretion von TX-A<sub>2</sub> durch eine Hemmung der Angiogenese zur Hemmung des Tumorwachstums führt [Nie et al., 2000]. So lässt sich die fehlende Hemmung des Tumorwachstums im von uns gewählten Beobachtungszeitraum auch durch die erhaltene Nährstoffversorgung des Tumors erklären, da die Therapie mit ASS-18 bzw. ASS-85 nicht ausreicht, um eine signifikante Reduktion der Kapillardichte über den gesamten Beobachtungszeitraum aufrechtzuerhalten.

Abschließend bleibt weiterhin fraglich, ob klinisch relevante Acetylsalicylsäure-Dosierungen die Tumorzellproliferation, die Tumorzellapoptose sowie das Tumorwachstum beeinflussen können, da die meisten der Erklärungsansätze aus in-vitro Versuchen stammen und größtenteils potentere Agenzien eingesetzt wurden. In-vivo Studien sind bisher rar und legen ihren Fokus nicht auf das primäre Tumorwachstum. Es wird zudem postuliert, dass eine antikanzerogene Wirkung der Acetylsalicylsäure erst nach einem längeren Einnahmeintervall erzielt werden kann. Rothwell et al. konnten erst ab einer mittleren Einnahmezeit von 5 Jahren einen Effekt auf Karzinome nachweisen [Rothwell et al., 2010].

## **5.9 Acetylsalicylsäure und Tumorangiogenese**

Eine Applikation von ASS-18 bzw. ASS-85 führte über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen zu einer Reduktion der Kapillardichte im gesamten Tumorareal im Vergleich zur

Kontrollgruppe. Für ASS-85 konnte im Vergleich zu ASS-18 eine stärkere Reduktion der Kapillardichte über den gesamten Beobachtungszeitraum gezeigt werden. Für die Applikation von ASS-85 konnte am Beobachtungstag 11 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Kapillardichte im Tumorrand erzielt werden. Die Reduktion der Kapillardichte in der IVM deckt sich mit den immunhistochemischen Ergebnissen der PECAM-1-Färbung. Hier konnte für ASS-18 und ASS-85 im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls eine nicht signifikante Reduktion der Angiogenese nachgewiesen werden. Für die Applikation von ASS-85 im Vergleich zu ASS-18 konnte analog zu den Ergebnissen der IVM eine stärkere, jedoch nicht signifikante Reduktion der Angiogenese nachgewiesen werden.

Als Ursache der antiangiogenen Wirkung der Acetylsalicylsäure werden in der Literatur verschiedene Ursachen diskutiert. Es wird postuliert, dass die Acetylsalicylsäure durch eine direkte Hemmung der Thrombozytenaktivierung zu einer verminderten Ausschüttung von VEGF, bFGF, EGF sowie verschiedener Zytokine und Metalloproteinasen führt und dadurch die Angiogenese hemmt. Der genaue Mechanismus bleibt jedoch weiterhin unklar. Es wird zudem analog zu den NMH eine P-Selektin-abhängige Reduktion der VEGF-Sekretion diskutiert [Gay et al., 2011, Matsui et al., 2012].

Neben einer direkten Hemmung der Thrombozytenaktivierung soll die Acetylsalicylsäure zudem durch eine Hemmung der COX-Isoenzyme und der dadurch bedingten Hemmung der PG-E2- sowie TX-A2-Sekretion die Angiogenese beeinflussen können. Diese These wird durch verschiedene Studien gestützt.

Im Rahmen der Angiogenese-Induktion kommt es durch eine vermehrte Expression der COX-Isoenzyme in den Tumor- und Endothelzellen zu einer gesteigerten Produktion von PG-E2 und TX-A2. PG-E2 als Hauptmetabolit der COX-2 bedingt durch eine Aktivierung des  $\beta$ -catenin/TCF-Signalwegs eine vermehrte Expression des VEGF. Shao et al. wiesen in ihrem Versuch an Kolonkarzinomzellen nach, dass eine Hemmung der PG-E2-Sekretion zu einer verminderten Expression des VEGF führt und dadurch die Tumorangioenese von Kolonkarzinomzellen hemmt [Shao et al., 2005]. Demgegenüber steht eine Studie von Nie et al. [2000], die für eine Stimulation mit PG-E2 keinen Effekt auf die Angiogenese im HUVEC-Modell nachweisen konnte [Nie et al., 2000]. Neben PG-E2 wird auch TX-A2 die Fähigkeit zur Aktivierung der Angiogenese zugeschrieben. Pradono et al. zeigten in einem balb-c Mausmodell an CT26.WT Kolonkarzinomzellen, dass durch TX-A2 die Tumorangioenese aktiviert werden kann [Pradono et al., 2002]. In ihrem Versuchsmodell konnte jedoch durch eine Inhibition von TX-A2 keine vollständige Hemmung der Endothelzellmigration erreicht

werden. So ist davon auszugehen, dass TX-A2 im Zusammenspiel mit mehreren Faktoren an der Angiogenese-Induktion beteiligt ist.

Die COX-1 bildet neben TX-A2 auch das Prostaglandin I<sub>2</sub> (PG-I<sub>2</sub>), das im Gegensatz zu TX-A2 eine Hemmung der Angiogenese hervorruft. Im Rahmen der Tumorzell-Thrombozyteninteraktion kommt es zu einer Änderung im Prostanoid-Profil der COX mit Verstärkung der TX-A2- und Hemmung der PG-I<sub>2</sub>-Synthese [Pradono et al., 2002]. So kann vermutet werden, dass die Acetylsalicylsäure durch Hemmung der Tumorzell-Thrombozyteninteraktion eine Änderung des Prostanoid-Profils zu Gunsten der PG-I<sub>2</sub>-Synthese verhindern kann.

Wir konnten für die 14-tägige Applikation der Acetylsalicylsäure in der vorliegenden Studie nur für den Beobachtungstag 11 eine signifikante Hemmung der Angiogenese für ASS-85 im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Die von uns gewählte Acetylsalicylsäure-Dosis reicht jedoch nicht aus, um eine signifikante Hemmung der Angiogenese über den gesamten Beobachtungszeitraum aufrechtzuerhalten bzw. eine Reduktion des Tumorwachstums durch Hemmung der Nährstoffzufuhr zu bedingen. Ursächlich hierfür scheint möglicherweise die bereits unter 5.8. diskutierte Dosis-abhängige Wirkung der Acetylsalicylsäure. So ist davon auszugehen, dass die von uns gewählte Dosis von 18mg/kg bzw. 85mg/kg nicht ausreicht um eine suffiziente Hemmung der COX-2- sowie COX-unabhängigen Signalwege hervorzurufen. Allerdings kann angenommen werden, dass durch die Dosis von 18mg/kg bzw. 85mg/kg eine ausreichende Hemmung der COX-1 sowie der TX-A2 Synthese erzielt werden kann. Entsprechend der Studie von Pradono et al. [2002] kann jedoch durch die isolierte TX-A2 Hemmung keine vollständige Hemmung der Angiogenese beobachtet werden. Es sollte jedoch bedacht werden, dass die zuvor diskutierten Studien lediglich Erklärungsansätze für eine mögliche antiangiogene Wirkung der Acetylsalicylsäure bieten. Die erzielten antiangiogenen Wirkungen konnten nur durch eine direkte Hemmung von PG-E<sub>2</sub> sowie TX-A2 erzielt werden.

Zur direkten Auswirkung der Acetylsalicylsäure auf die Angiogenese existiert bisher nur eine Studie von Dai et al. [2017]. Sie zeigten in ihrer in-vivo Studie an humanen Mammakarzinomzellen analog zu den NMH, dass die Acetylsalicylsäure in einem COX-unabhängigen Weg durch eine Hemmung der Heparanase die Angiogenese und das Tumorwachstum signifikant beeinflusst [Dai et al., 2017]. Hierbei wurden im Vergleich zu unserer Arbeit deutlich höhere Dosen von 125mg/kg bzw. 250mg/kg über einen Beobachtungszeitraum von 20 Tagen verabreicht. Es konnte jedoch im Vergleich zu unserem Versuchsmodell erst für die fast 3-fach höhere Dosis von 250mg/kg eine Signifikanz erreicht werden. Hierbei sollte berücksichtigt werden, dass mit steigender Tagesdosis auch das Risiko

gastrointestinaler Komplikationen steigt und diese Dosis so nicht für den humanen Gebrauch verwendet werden kann [Dovizio et al., 2012].

Entsprechend unseren Ergebnissen kann die in der Literatur beobachtete Senkung der Mortalität von kolorektalen Karzinom für klinisch relevante Acetylsalicylsäure-Dosen nicht auf eine Hemmung der Tumorangiogenese und des Tumorwachstums zurückgeführt werden [Elwood et al., 2016]. Es ist weiterhin davon auszugehen, dass die in der Literatur postulierte Reduktion thrombembolischer Komplikationen [Elwood et al., 2016] sowie die Reduktion der Metastasierung [Rothwell et al., 2012] für die beobachtete Senkung der Mortalität verantwortlich sind.

## 5.10 Schlussfolgerung

Klinisch relevante Dosierungen von NMH und Acetylsalicylsäure vermochten nicht, das Wachstum von GFP-transfizierten CT-26.WT Kolonkarzinomzellen über einen 14-tägigen Beobachtungszeitraum zu hemmen. Trotz fehlender Hemmung des Tumorwachstums konnte für die Applikation von Tinzaparin-Natrium, Fondaparinux, aber auch für Acetylsalicylsäure am Beobachtungstag 11, eine signifikante Reduktion der Tumorangiogenese nachgewiesen werden. Für Tinzaparin-Natrium konnte außerdem eine Hemmung der Tumorzellproliferation am Beobachtungstag 14 erreicht werden. Zudem konnten wir für ASS-85 im Vergleich zu ASS-18 eine signifikante Steigerung der Tumorzelloptose nachweisen. Es bleibt offen, ob eine längere Applikationsdauer klinisch relevanter Dosierungen bei teils signifikanter Reduktion der Tumorangiogenese, der Tumorzellproliferation sowie Induktion der Tumorzelloptose zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen kann oder ob die in der Literatur postulierten antiangiogenen sowie antiproliferativen Eigenschaften nicht ausreichen, um das Tumorwachstum zu inhibieren. Hierbei sollte auch bedacht werden, dass die bisher postulierten antiangiogenen sowie antiproliferativen Eigenschaften lediglich für sehr hohe Dosierungen erreicht werden konnten, die auf den klinischen Alltag aufgrund des steigenden Risikos an Blutungskomplikationen nur bedingt übertragbar sind. Das nachgewiesene antiangiogene sowie antiproliferative Potenzial der untersuchten Substanzen könnte jedoch klinisch genutzt werden, um synergistisch zur Chemotherapie eine lokale Tumorkontrolle zu gewährleisten und die Metastasierung zu hemmen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Alcalay A, Wun T, Khatri V, Chew HK, Harvey D, Zhou H, White RH (2006) Venous thromboembolism in patients with colorectal cancer: incidence and effect on survival. *J Clin Oncol* 24:1112-1118
2. Alyahya R, Sudha T, Racz M, Stain SC, Mousa SA (2015) Anti-metastasis efficacy and safety of non-anticoagulant heparin derivative versus low molecular weight heparin in surgical pancreatic cancer models. *Int J Oncol* 46:1225-1231
3. Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Francis JL (2003) Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *J Thromb Haemost* 1:1972-1976
4. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A (2004) Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350:2343-2351
5. Andress DL (1995) Heparin modulates the binding of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 to a membrane protein in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 270:28289-28296
6. Bar-Ner M, Eldor A, Wasserman L, Matzner Y, Cohen IR, Fuks Z, Vlodaysky I (1987) Inhibition of heparanase-mediated degradation of extracellular matrix heparan sulfate by non-anticoagulant heparin species. *Blood* 70:551-557
7. Battinelli EM, Markens BA, Kulenthirarajan RA, Machlus KR, Flaumenhaft R, Italiano JE, Jr. (2014) Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. *Blood* 123:101-112
8. Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401-410
9. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A (2001) Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3352-3357
10. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevich-Jelic L, Daban A, Bardet E, Beny A, Ollier JC (2006) Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 355:1114-1123
11. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC (1996) How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 69:135-174
12. Brenner H, Kloor M, Pox CP (2014) Colorectal cancer. *Lancet* 383:1490-1502
13. Cao C, Yan TD, Black D, Morris DL (2009) A systematic review and meta-analysis of cytoreductive surgery with perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Ann Surg Oncol* 16:2152-2165
14. Cardwell CR, Kunzmann AT, Cantwell MM, Hughes C, Baron JA, Powe DG, Murray LJ (2014) Low-dose aspirin use after diagnosis of colorectal cancer does not increase survival: a case-control analysis of a population-based cohort. *Gastroenterology* 146:700-708.e702
15. Carmazzi Y, Iorio M, Armani C, Cianchetti S, Raggi F, Neri T, Cordazzo C, Petrini S, Vanacore R, Bogazzi F, Paggiaro P, Celi A (2012) The mechanisms of nadroparin-mediated inhibition of proliferation of two human lung cancer cell lines. *Cell Prolif* 45:545-556
16. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzen F, Saltz L (2008) Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:2006-2012
17. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS (2007) Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med* 356:2131-2142

18. Clancy C, Burke JP, Barry M, Kalady MF, Calvin Coffey J (2014) A meta-analysis to determine the effect of primary tumor resection for stage IV colorectal cancer with unresectable metastases on patient survival. *Ann Surg Oncol* 21:3900-3908
19. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, Carteni G, Agostara B, Pezzella G, Manzione L, Borsellino N, Misino A, Romito S, Durini E, Cordio S, Di Seri M, Lopez M, Maiello E, Montemurro S, Cramarossa A, Lorusso V, Di Bisceglie M, Chiarenza M, Valerio MR, Guida T, Leonardi V, Pisconti S, Rosati G, Carrozza F, Nettis G, Valdesi M, Filippelli G, Fortunato S, Mancarella S, Brunetti C (2005) Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol* 23:4866-4875
20. Da Pozzo E, Barsotti MC, Bendinelli S, Martelli A, Calderone V, Balbarini A, Martini C, Di Stefano R (2012) Differential effects of fondaparinux and bempiparin on angiogenic and vasculogenesis-like processes. *Thromb Res* 130:e113-122
21. Dai XY, Yan J, Fu X, Pan Q, Sun D, Xu Y, Wang J, Nie L, Tong LJ, Shen A, Zheng M, Huang M, Tan M, Liu H, Huang X, Ding J, Geng M (2017) Aspirin inhibits cancer metastasis and angiogenesis via targeting heparanase. *Clin Cancer Res*
22. Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M (2003) Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol* 162:1503-1513
23. de Jong MC, van Vledder MG, Ribero D, Hubert C, Gigot JF, Choti MA, Schulick RD, Capussotti L, Dejong CH, Pawlik TM (2011) Therapeutic efficacy of combined intraoperative ablation and resection for colorectal liver metastases: an international, multi-institutional analysis. *J Gastrointest Surg* 15:336-344
24. Debergh I, Pattyn P, Ceelen W (2015) Microvascular effects of the low molecular weight heparins in a colorectal xenograft model: an intravital microscopy study. *J Surg Res* 194:488-495
25. Debergh I, Van Damme N, Pattyn P, Peeters M, Ceelen WP (2010) The low-molecular-weight heparin, nadroparin, inhibits tumour angiogenesis in a rodent dorsal skinfold chamber model. *Br J Cancer* 102:837-843
26. Diaz-Rubio E, Tabernero J, Gomez-Espana A, Massuti B, Sastre J, Chaves M, Abad A, Carrato A, Queralt B, Reina JJ, Maurel J, Gonzalez-Flores E, Aparicio J, Rivera F, Losa F, Aranda E (2007) Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with continuous-infusion fluorouracil plus oxaliplatin as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: final report of the Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors Trial. *J Clin Oncol* 25:4224-4230
27. Din FV, Valanciute A, Houde VP, Zibrova D, Green KA, Sakamoto K, Alessi DR, Dunlop MG (2012) Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 142:1504-1515.e1503
28. Dogan OT, Polat ZA, Karahan O, Epozturk K, Altun A, Akkurt I, Cetin A (2011) Antiangiogenic activities of bempiparin sodium, enoxaparin sodium, nadroparin calcium and tinzaparin sodium. *Thromb Res* 128:e29-32
29. Dovizio M, Maier TJ, Alberti S, Di Francesco L, Marcantoni E, Munch G, John CM, Suess B, Sgambato A, Steinhilber D, Patrignani P (2013) Pharmacological inhibition of platelet-tumor cell cross-talk prevents platelet-induced overexpression of cyclooxygenase-2 in HT29 human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 84:25-40
30. Dovizio M, Tacconelli S, Sostres C, Ricciotti E, Patrignani P (2012) Mechanistic and pharmacological issues of aspirin as an anticancer agent. *Pharmaceuticals (Basel)* 5:1346-1371
31. Dudek W, Schreiner W, Stapel P, Vassos N, Grutzmann R, Sirbu H (2016) [Surgery of colorectal lung metastases : Results of a survey in Germany]. *Chirurg*

32. Duman-Scheel M (2012) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) pathfinding: axon guidance gene finally turned tumor suppressor. *Curr Drug Targets* 13:1445-1453
33. Elwood PC, Morgan G, Pickering JE, Galante J, Weightman AL, Morris D, Kelson M, Dolwani S (2016) Aspirin in the Treatment of Cancer: Reductions in Metastatic Spread and in Mortality: A Systematic Review and Meta-Analyses of Published Studies. *PLoS One* 11:e0152402
34. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crino L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L, Cortesi E, Picone V, Vitello S, Chiara S, Granetto C, Porcile G, Fioretto L, Orlandini C, Andreuccetti M, Masi G (2007) Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 25:1670-1676
35. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767
36. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186
37. Folkman J (1990) Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev* 9:171-174
38. Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, Wierzbicki R, Ganju V, Jeffery M, Schulz J, Richards D, Soufi-Mahjoubi R, Wang B, Barrueco J (2007) Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J Clin Oncol* 25:4779-4786
39. Garcia J, Callewaert N, Borsig L (2007) P-selectin mediates metastatic progression through binding to sulfatides on tumor cells. *Glycobiology* 17:185-196
40. Gay LJ, Felding-Habermann B (2011) Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 11:123-134
41. Gerard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouche O, Chapet O, Closon-Dejardin MT, Untereiner M, Leduc B, Francois E, Maurel J, Seitz JF, Buecher B, Mackiewicz R, Ducreux M, Bedenne L (2006) Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol* 24:4620-4625
42. Giannini R, Lupi C, Loupakis F, Servadio A, Cremolini C, Sensi E, Chiarugi M, Antoniotti C, Basolo F, Falcone A, Fontanini G (2014) and genotyping of synchronous colorectal carcinomas. *Oncol Lett* 7:1532-1536
43. Graefe KH, Lutz W, Bönisch H (2011) In: *Pharmakologie und Toxikologie*. 2011 ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart,
44. Gray E, Mulloy B, Barrowcliffe TW (2008) Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thromb Haemost* 99:807-818
45. Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, Kerr DJ (2007) Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 370:2020-2029
46. Guerrera F, Mossetti C, Ceccarelli M, Bruna MC, Bora G, Olivetti S, Lausi PO, Solidoro P, Ciccone G, Ruffini E, Oliaro A, Filosso PL (2016) Surgery of colorectal cancer lung metastases: analysis of survival, recurrence and re-surgery. *J Thorac Dis* 8:1764-1771
47. Guillem-Llobat P, Dovizio M, Bruno A, Ricciotti E, Cufino V, Sacco A, Grande R, Alberti S, Arena V, Cirillo M, Patrono C, FitzGerald GA, Steinhilber D, Sgambato A, Patrignani P (2016) Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cells. *Oncotarget*
48. Handschin AE, Trentz OA, Hoerstrup SP, Kock HJ, Wanner GA, Trentz O (2005) Effect of low molecular weight heparin (dalteparin) and fondaparinux (Arixtra) on human osteoblasts in vitro. *Br J Surg* 92:177-183



49. Harper KA, Tyson-Capper AJ (2008) Complexity of COX-2 gene regulation. *Biochem Soc Trans* 36:543-545
50. Holroyd EW, Delacroix S, Larsen K, Harbuzariu A, Psaltis PJ, Wang L, Pan S, White TA, Witt TA, Kleppe LS, Mueske CS, Mukhopadhyay D, Simari RD (2012) Tissue factor pathway inhibitor blocks angiogenesis via its carboxyl terminus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:704-711
51. Holzel D, Eckel R, Engel J (2009) [Colorectal cancer metastasis. Frequency, prognosis, and consequences]. *Chirurg* 80:331-340
52. Hu L, Xia L, Zhou H, Wu B, Mu Y, Wu Y, Yan J (2013) TF/FVIIa/PAR2 promotes cell proliferation and migration via PKCalpha and ERK-dependent c-Jun/AP-1 pathway in colon cancer cell line SW620. *Tumour Biol* 34:2573-2581
53. Ines C, Donia O, Rahma B, Ben Ammar A, Sameh A, Khalfallah T, Abdelmajid BH, Sabeih M, Saadia B (2014) Implication of K-ras and p53 in colorectal cancer carcinogenesis in Tunisian population cohort. *Tumour Biol* 35:7163-7175
54. Javeed A, Hou Y, Duan K, Zhang B, Shen H, Cao Y, Zhao Y (2011) Aspirin significantly decreases the nonopsonic phagocytosis and immunogenicity of macrophages in mice. *Inflamm Res* 60:389-398
55. Jayne DG, Thorpe HC, Copeland J, Quirke P, Brown JM, Guillou PJ (2010) Five-year follow-up of the Medical Research Council CLASICC trial of laparoscopically assisted versus open surgery for colorectal cancer. *Br J Surg* 97:1638-1645
56. Jiang C, Wang Q, Xu Z, Li WS, Chen C, Yao XQ, Liu FK (2015) Cyclooxygenase-2 knockdown using retinoic acid chalcone (RAC), a promising therapeutic strategy for colon cancer. *Am J Cancer Res* 5:2012-2021
57. Kabbinar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, Mass R, Perrou B, Nelson B, Novotny WF (2005) Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 23:3697-3705
58. Kakkar AK, Levine MN, Kadziola Z, Lemoine NR, Low V, Patel HK, Rustin G, Thomas M, Quigley M, Williamson RC (2004) Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin Oncol* 22:1944-1948
59. Kawai K, Watanabe T (2014) Colorectal cancer and hypercoagulability. *Surg Today* 44:797-803
60. Khorana AA, Sahni A, Altland OD, Francis CW (2003) Heparin inhibition of endothelial cell proliferation and organization is dependent on molecular weight. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2110-2115
61. Kollmar O, Junker B, Rupertus K, Menger MD, Schilling MK (2007) Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis. *Eur J Surg Oncol* 33:803-811
62. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Junker B, Tilton B, Schilling MK, Menger MD (2007) Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. *Neoplasia* 9:862-870
63. Konopke R, Saeger HD (2003) [Liver metastases. Diagnosis and therapy]. *Chirurg* 74:866-884; quiz 885-866
64. Laschke MW, Vollmar B, Menger MD (2011) The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater* 22:147-164; discussion 164-147
65. Lee WS, Yun SH, Chun HK, Lee WY, Yun HR, Kim J, Kim K, Shim YM (2007) Pulmonary resection for metastases from colorectal cancer: prognostic factors and survival. *Int J Colorectal Dis* 22:699-704
66. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143:1055-1062

67. Li LF, Huang CC, Lin HC, Tsai YH, Quinn DA, Liao SK (2009) Unfractionated heparin and enoxaparin reduce high-stretch ventilation augmented lung injury: a prospective, controlled animal experiment. *Crit Care* 13:R108
68. Liang Y, Li G, Chen P, Yu J (2008) Laparoscopic versus open colorectal resection for cancer: a meta-analysis of results of randomized controlled trials on recurrence. *Eur J Surg Oncol* 34:1217-1224
69. Lin JK, Lin PC, Lin CH, Jiang JK, Yang SH, Liang WY, Chen WS, Chang SC (2014) Clinical relevance of alterations in quantity and quality of plasma DNA in colorectal cancer patients: based on the mutation spectra detected in primary tumors. *Ann Surg Oncol* 21 Suppl 4:S680-686
70. Liu Y, Mueller BM (2006) Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 344:1263-1270
71. Manaster J, Chezard J, Shurtz-Swirski R, Shapiro G, Tendler Y, Kristal B, Shasha SM, Sela S (1996) Heparin induces apoptosis in human peripheral blood neutrophils. *Br J Haematol* 94:48-52
72. Matsui Y, Amano H, Ito Y, Eshima K, Suzuki T, Ogawa F, Iyoda A, Satoh Y, Kato S, Nakamura M, Kitasato H, Narumiya S, Majima M (2012) Thromboxane A(2) receptor signaling facilitates tumor colonization through P-selectin-mediated interaction of tumor cells with platelets and endothelial cells. *Cancer Sci* 103:700-707
73. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 11:293-299
74. Menger MD, Laschke MW, Vollmar B (2002) Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34:83-91
75. Mitrugno A, Sylman JL, Ngo AT, Pang J, Sears RC, Williams CD, McCarty OJ (2017) Aspirin therapy reduces the ability of platelets to promote colon and pancreatic cancer cell proliferation: Implications for the oncoprotein c-MYC. *Am J Physiol Cell Physiol* 312:C176-c189
76. Mitry E, Fields AL, Bleiberg H, Labianca R, Portier G, Tu D, Nitti D, Torri V, Elias D, O'Callaghan C, Langer B, Martignoni G, Bouche O, Lazorthes F, Van Cutsem E, Bedenne L, Moore MJ, Rougier P (2008) Adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of metastases from colorectal cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *J Clin Oncol* 26:4906-4911
77. Morson BC (1962) Precancerous lesions of the colon and rectum. Classification and controversial issues. *Jama* 179:316-321
78. Mousa SA (2013) Comparative pharmacodynamic assessment of the antiangiogenesis activity of heparin and low-molecular-weight heparin fractions: structure-function relationship. *Clin Appl Thromb Hemost* 19:48-54
79. Mousa SA, Bozarth J, Barrett JS (2003) Pharmacodynamic properties of the low molecular weight heparin, tinzaparin: effect of molecular weight distribution on plasma tissue factor pathway inhibitor in healthy human subjects. *J Clin Pharmacol* 43:727-734
80. Mousa SA, Mohamed S (2004) Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 92:627-633
81. Mousa SA, Petersen LJ (2009) Anti-cancer properties of low-molecular-weight heparin: preclinical evidence. *Thromb Haemost* 102:258-267
82. Nadir Y, Brenner B (2014) Heparanase multiple effects in cancer. *Thromb Res* 133 Suppl 2:S90-94
83. Nie D, Lamberti M, Zacharek A, Li L, Szekeres K, Tang K, Chen Y, Honn KV (2000) Thromboxane A(2) regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 267:245-251

84. Niers TM, Klerk CP, DiNisio M, Van Noorden CJ, Buller HR, Reitsma PH, Richel DJ (2007) Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol* 61:195-207
85. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M, Jaeck D, Mirza D, Parks RW, Mauer M, Tanis E, Van Cutsem E, Scheithauer W, Gruenberger T (2013) Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 14:1208-1215
86. Norrby K (2006) Low-molecular-weight heparins and angiogenesis. *Apmis* 114:79-102
87. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM (1996) Suppression of intestinal polyposis in *Apc delta716* knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87:803-809
88. Papathanasopoulos A, Kouroupis D, Henshaw K, McGonagle D, Jones EA, Giannoudis PV (2011) Effects of antithrombotic drugs fondaparinux and tinzaparin on in vitro proliferation and osteogenic and chondrogenic differentiation of bone-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 29:1327-1335
89. Parau A, Vlad L (2014) Colorectal cancer with liver metastases -- is there a chance for cure? *Chirurgia (Bucur)* 109:161-167
90. Pathi S, Jutooru I, Chadalapaka G, Nair V, Lee SO, Safe S (2012) Aspirin inhibits colon cancer cell and tumor growth and downregulates specificity protein (Sp) transcription factors. *PLoS One* 7:e48208
91. Pfannschmidt J, Muley T, Hoffmann H, Dienemann H (2003) Prognostic factors and survival after complete resection of pulmonary metastases from colorectal carcinoma: experiences in 167 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126:732-739
92. Porschen R, Arkenau HT, Kubicka S, Greil R, Seufferlein T, Freier W, Kretschmar A, Graeven U, Grothey A, Hinke A, Schmiegel W, Schmoll HJ (2007) Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and leucovorin plus oxaliplatin in metastatic colorectal cancer: a final report of the AIO Colorectal Study Group. *J Clin Oncol* 25:4217-4223
93. Pox C, Aretz S, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heussner P, Hohenberger W, Holstege A, Hubner J, Kolligs F, Kreis M, Lux P, Ockenga J, Porschen R, Post S, Rahner N, Reinacher-Schick A, Riemann JF, Sauer R, Sieg A, Scheppach W, Schmitt W, Schmoll HJ, Schulmann K, Tannapfel A, Schmiegel W (2013) [S3-guideline colorectal cancer version 1.0]. *Z Gastroenterol* 51:753-854
94. Pox C, Schmiegel W, Nitschmann S (2008) [ASS in the prophylaxis of colorectal cancer]. *Internist (Berl)* 49:360-362
95. Pradono P, Tazawa R, Maemondo M, Tanaka M, Usui K, Saijo Y, Hagiwara K, Nukiwa T (2002) Gene transfer of thromboxane A(2) synthase and prostaglandin I(2) synthase antithetically altered tumor angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 62:63-66
96. Prandoni P, Falanga A, Piccioli A (2005) Cancer and venous thromboembolism. *Lancet Oncol* 6:401-410
97. Pross M, Lippert H, Misselwitz F, Nestler G, Kruger S, Langer H, Halangk W, Schulz HU (2003) Low-molecular-weight heparin (reviparin) diminishes tumor cell adhesion and invasion in vitro, and decreases intraperitoneal growth of colonadeno-carcinoma cells in rats after laparoscopy. *Thromb Res* 110:215-220
98. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb j* 22:659-661
99. Rickles FR, Falanga A (2001) Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res* 102:V215-224
100. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, Meade TW (2010) Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 376:1741-1750

101. Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JF, Meade TW, Mehta Z (2012) Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet* 379:1591-1601
102. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzen F, Cassidy J (2008) Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 26:2013-2019
103. Sample D, Wargovich M, Fischer SM, Inamdar N, Schwartz P, Wang X, Do KA, Sinicrope FA (2002) A dose-finding study of aspirin for chemoprevention utilizing rectal mucosal prostaglandin E(2) levels as a biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:275-279
104. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A (1990) Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history. *Br J Surg* 77:1241-1246
105. Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D (1993) Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Bmj* 306:752-755
106. Senger S, Kollmar O, Menger MD, Rupertus K (2015) Darbepoetin-alpha Promotes Cell Proliferation in Established Extrahepatic Colorectal Tumors after Major Hepatectomy. *Eur Surg Res* 56:49-60
107. Shao J, Jung C, Liu C, Sheng H (2005) Prostaglandin E2 Stimulates the beta-catenin/T cell factor-dependent transcription in colon cancer. *J Biol Chem* 280:26565-26572
108. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN (1998) Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 58:362-366
109. Shussman N, Wexner SD (2014) Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 2:1-15
110. Simmonds PC, Primrose JN, Colquitt JL, Garden OJ, Poston GJ, Rees M (2006) Surgical resection of hepatic metastases from colorectal cancer: a systematic review of published studies. *Br J Cancer* 94:982-999
111. Siragusa S, Cosmi B, Piovella F, Hirsh J, Ginsberg JS (1996) Low-molecular-weight heparins and unfractionated heparin in the treatment of patients with acute venous thromboembolism: results of a meta-analysis. *Am J Med* 100:269-277
112. Soker S, Goldstaub D, Svahn CM, Vlodaysky I, Levi BZ, Neufeld G (1994) Variations in the size and sulfation of heparin modulate the effect of heparin on the binding of VEGF165 to its receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1339-1347
113. Sostres C, Gargallo CJ, Lanás A (2014) Aspirin, cyclooxygenase inhibition and colorectal cancer. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 5:40-49
114. Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, Polyzos A, Ziras N, Athanasiadis A, Kakolyris S, Tsousis S, Kouroussis C, Vamvakas L, Kalykaki A, Samonis G, Mavroudis D, Georgoulas V (2006) FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Br J Cancer* 94:798-805
115. Stevenson JL, Choi SH, Varki A (2005) Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins--correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin Cancer Res* 11:7003-7011
116. Takahashi H, Ebihara S, Okazaki T, Asada M, Sasaki H, Yamaya M (2005) A comparison of the effects of unfractionated heparin, dalteparin and danaparoid on vascular endothelial growth factor-induced tumour angiogenesis and heparanase activity. *Br J Pharmacol* 146:333-343
117. Thomford NR, Woolner LB, Clagett OT (1965) THE SURGICAL TREATMENT OF METASTATIC TUMORS IN THE LUNGS. *J Thorac Cardiovasc Surg* 49:357-363

118. Tieken C, Versteeg HH (2016) Anticoagulants versus cancer. *Thromb Res* 140 Suppl 1:S148-153
119. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A (2004) FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22:229-237
120. Trousseau A, Bazere P, Cormack J (1867) *Lectures of Clinical Medicine*.
121. Tsai JH, Liao JY, Lin YL, Lin LI, Cheng YC, Cheng ML, Jeng YM (2014) Traditional serrated adenoma has two pathways of neoplastic progression that are distinct from the sessile serrated pathway of colorectal carcinogenesis. *Mod Pathol* 27:1375-1385
122. van Gestel YR, de Hingh IH, van Herk-Sukel MP, van Erning FN, Beerepoot LV, Wijsman JH, Slooter GD, Rutten HJ, Creemers GJ, Lemmens VE (2014) Patterns of metachronous metastases after curative treatment of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol* 38:448-454
123. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH (2013) New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* 93:327-358
124. Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Petersen HH, Ahamed J, Felding-Habermann B, Takada Y, Mueller BM, Ruf W (2008) Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood* 111:190-199
125. Verwaal VJ, Bruin S, Boot H, van Slooten G, van Tinteren H (2008) 8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 15:2426-2432
126. Vlodavsky I, Abboud-Jarrous G, Elkin M, Naggi A, Casu B, Sasisekharan R, Ilan N (2006) The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 35:116-127
127. Vlodavsky I, Ilan N, Nadir Y, Brenner B, Katz BZ, Naggi A, Torri G, Casu B, Sasisekharan R (2007) Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression. *Thromb Res* 120 Suppl 2:S112-120
128. Wei M, Tai G, Gao Y, Li N, Huang B, Zhou Y, Hao S, Zeng X (2004) Modified heparin inhibits P-selectin-mediated cell adhesion of human colon carcinoma cells to immobilized platelets under dynamic flow conditions. *J Biol Chem* 279:29202-29210
129. Williams CS, Luongo C, Radhika A, Zhang T, Lamps LW, Nanney LB, Beauchamp RD, DuBois RN (1996) Elevated cyclooxygenase-2 levels in Min mouse adenomas. *Gastroenterology* 111:1134-1140
130. Xu H, Ploplis VA, Castellino FJ (2006) A coagulation factor VII deficiency protects against acute inflammatory responses in mice. *J Pathol* 210:488-496
131. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, Coomber BL, Mackman N, Rak JW (2005) Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 105:1734-1741

## 7 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APC	adenomatous polyposis coli
ASS-18	Acetylsalicylsäure 18mg/kg
ASS-85	Acetylsalicylsäure 85mg/kg
ATIII	Antithrombin III
Bcl-2	B-Zell-Lymphom-2
bFGF	basic fibroblast growth factor
BRAF	B-rat fibrosarcoma
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD-31	cluster of differentiation 31-Protein
CIN	chromosomale Instabilität
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
CP	cancer procoagulant
DCC	deleted in colorectal carcinoma
ECM	Extrazellulärmatrix
EGFR	epidermal growth factor receptor
ENOXA-12	Enoxaparin-Natrium 12mg/kg
ENOXA-6	Enoxaparin-Natrium 6mg/kg
ERK-1	extracellular-signal regulated kinase 1
ERK-2	extracellular-signal regulated kinase 2
FONDA-1,25	Fondaparinux 1,25mg/kg
FVII	Faktor VII
FX	Faktor X
FXIII	Faktor XIII
GFP	green fluorescent protein
GPIb	Glykoprotein Ib
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa

HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	hypoxia-inducible factor
HIPEC	hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
HPF	High-Power-Field
i.p.	intraperitoneal
IGF	Insulin like growth factor
Il-12	Interleukin 12
IL-8	Interleukin 8
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LITT	laserinduzierte interstitielle Thermotheapie
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NMH	niedermolekulares Heparin
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAR	protease activated receptor
PARs	protease activated receptors
PCNA	proliferating-cell-nuclear antigen
PDGF	platelet-derived growth factor
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
Pf-4	platelet factor 4
PG-E2	Prostaglandin E2
RFA	Radiofrequenzablation
ROI	regions of interest
s.	siehe
s.c.	subcutan
SALT	Swedish Aspirin low dose Trial
SEM	standard error of the mean
SIRT	selektive interne Radiotherapie
Tab.	Tabelle
TCF	transcription factor

TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor pathway inhibitor
tgl.	taglich
TINZA-10	Tinzaparin-Natrium 10mg/kg
TINZA-20	Tinzaparin-Natrium 20mg/kg
t-PA	tissue type plasminogen aktivator
TPT	Thrombosis Prevention Trial
TX	Thromboxan
TX-A2	Thromboxan A2
UFH	unfraktioniertes Heparin
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von Willebrandt -Faktor



## 8 Publikationen

In Vorbereitung :

- ***„Does size really matters? The LMWH enoxaparin shows no effects on angiogenesis and tumor growth of extrahepatic colorectal metastasis in an experimental mice model“***

Christian Ziemann, Stephanie Wahl, Matthias Laschke, Otto Kolmar, Jens Sperling, Matthias Glanemann, Michael D Menger

- ***„Fondaparinux does not show any effects on growth of extrahepatic colorectal metastases“***

Christian Ziemann, Stephanie Wahl, Matthias Laschke, Otto Kolmar, Jens Sperling, Matthias Glanemann, Michael D Menger

- ***„Tinzaparin inhibits angiogenesis but not growth of extrahepatic colorectal carcinoma in an experimental mice model“***

Christian Ziemann, Stephanie Wahl, Matthias Laschke, Otto Kolmar, Jens Sperling, Matthias Glanemann, Michael D Menger

- ***„Aspirin inhibits angiogenesis and induces apoptosis but does not influence growth of extrahepatic colorectal metastasis in a dorsal skinfold chamber model“***

Christian Ziemann, Stephanie Wahl, Matthias Laschke, Otto Kolmar, Jens Sperling, Matthias Glanemann, Michael D Menger

## 9 Dank

Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation mit der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Glanemann) und des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. med. Michael D. Menger) durchgeführt.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger sowie Herrn PD Dr. med. Otto Kollmar danke ich für die Überlassung des Themas und die stets außergewöhnliche Unterstützung bei der Anfertigung meiner Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. med. Michael D. Menger sowie an Dr. med. Christian Ziemann für die herausragende fachliche Betreuung der Arbeit, die Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse sowie die Anleitung zu sehr selbstständigem experimentellen Arbeiten und die stets konstruktive Kritik bei der Niederschrift der Arbeit.

Ein weiterer Dank geht zudem an Dr. med. Stephan Müller, Dr. Sascha Kleer und Dr. Christina Körbel für die tatkräftige Unterstützung beim Erlernen des Operationsablaufes, der Einweisung in die computergestützten Ergebnisanalysen sowie die Hilfe bei Problemen im Rahmen des Versuchsablaufes.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Matthias Laschke für die Hilfe bei Problemen im Rahmen des Versuchsablaufes sowie bei technischen Schwierigkeiten.

Ich danke Dr. Claudia Scheuer und Christina Marx für die Beratung im Umgang mit den Tumorzellen und deren exzellente Aufbereitung.

Vielen Dank an Janine Becker für die Bearbeitung und Färbung der histologischen Schnitte.

Bei Annamaria Stolmar und Stephanie Angel bedanke ich mich für die Hilfe bei zeitlichen Engpässen.

## **10 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.