

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
Universität des Saarlandes
Homburg / Saar
Direktor: Prof. Dr. med. M.D. Menger**

**ISOLIERTE HEPATISCHE PERFUSION UND
HEPATO-ARTERIELLE INFUSION
VON TUMOR NEKROSE FAKTOR ALPHA**

**Eine Untersuchung zur Wirkung von rh TNF-alpha 1a
an einem Metastasenmodell der Rattenleber**

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

2007

vorgelegt von

Jens Sperling

geboren am 08.04.1978 in Mayen

1. Tag der Promotion:

2. Dekan:

3. Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung	01
1.1. Isolierte hepatische Perfusion und hepato-arterielle Infusion von TNF- α in einem Metastasenmodell der Rattenleber	01
2. Abstract	03
2.1. Isolated hepatic perfusion and hepatic arterial infusion of TNF- α in a rat liver metastasis model	03
3. Einleitung	05
3.1. Klinischer Hintergrund.....	05
3.1.1. Kolorektales Karzinom.....	05
3.1.2. Lebermetastasen.....	05
3.1.3. Leberresektion.....	06
3.1.4. Systemische Chemotherapie.....	06
3.1.5. Nichtoperative Ablationsverfahren.....	07
3.2 Regionale Chemotherapie.....	07
3.2.1. Isolierte Perfusion	07
3.2.2. Isolierte hepatische Perfusion (IHP)	08
3.2.3. Hepato-arterielle Infusion (HAI)	10
3.3. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α).....	12
3.3.1. Historie.....	12
3.3.2. Physiologie und Biochemie.....	12
3.3.3. Klinische und experimentelle Untersuchungen	13
4. Ziel der Studie	14
4.1. Fragestellung	14
5. Material und Methoden	15
5.1. Versuchstiere.....	15
5.2. Tumor	15

5.3. Tumorimplantation.....	16
5.4. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)	17
5.5. Modell	17
5.5.1. Anästhesie und vorläufige chirurgische Präparation.....	17
5.5.2. Chirurgische Präparation des isolierten Perfusionsmodells (IHP)	18
5.5.3. Chirurgische Präparation des Infusionsmodells (HAI).....	18
5.6. Perfusion und Infusion der Leber.....	19
5.6.1. Ablauf der isolierten hepatischen Perfusion	19
5.6.2. Ablauf der hepato-arteriellen Infusion.....	21
5.7. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	22
5.8. Untersuchungstechniken.....	24
5.8.1. Quantitative Bildanalyse und mikrozirkulatorische Parameter.....	24
5.8.1.1. Perfusionsausfälle	24
5.8.1.2. Endotheliale Leukozytenadhäsion	25
5.8.1.3. Flussgeschwindigkeit.....	26
5.8.2. Makrohämodynamik	27
5.8.3. Hämatologische Parameter und Enzymaktivitäten	27
5.8.4. Histomorphologie.....	28
5.8.4.1. Leberhistologie	28
5.8.5. Immunhistochemie	30
5.8.5.1. Caspase-3	30
5.8.5.2. PCNA (Proliferating Nuclear Cell Antigen).....	30
5.9. Experimentelles Protokoll	32
5.9.1 Protokoll der Perfusion (IHP)	32
5.9.2 Protokoll der Infusion (HAI).....	33
5.10. Datenerfassung und Statistik	33
6. Ergebnisse.....	34
6.1. Isolierte hepatische Perfusion	34
6.1.1. Tumorwachstum	34
6.1.2. Modell der IHP.....	34
6.1.3. Intravitalmikroskopie	35
6.1.3.1. Perfusion der Sinusoide und Tumorkapillaren	35
6.1.3.2. Flussgeschwindigkeit in Lebervenenolen und Tumorgefäßen	36
6.1.3.3. Leukozytenadhärenz	37
6.1.4. Histologie	39

6.1.4.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)	39
6.1.4.2. AS-D Chloracetatesterase (CAE)	41
6.1.5. Immunhistochemie.....	42
6.1.5.1. Apoptoseindex, Caspase 3.....	42
6.1.5.2. Proliferationsindex, PCNA.....	43
6.1.6. Laborchemische Parameter	44
6.1.6.1 Leberenzyme.....	44
6.1.6.2 Zytokine	44
6.1.6.2 Transhepatische TNF-alpha-Passage.....	45
6.2. Hepato-arterielle Infusion	47
6.2.1. Tumorwachstum	47
6.2.2. Modell der HAI	47
6.2.3. Intravitalmikroskopie	48
6.2.3.1. Perfusion der Sinusoide und Tumorkapillaren	48
6.2.3.2. Flussgeschwindigkeit in Lebervenen und Tumorgefäßen	49
6.2.3.3. Leukozytenadhärenz	50
6.2.4. Histologie	51
6.2.4.1. Hämatoxylin-Eosin (HE).....	51
6.2.4.2. AS-D Chloracetatesterase (CAE)	53
6.2.5. Immunhistochemie.....	54
6.2.5.1. Apoptoseindex, Caspase 3.....	54
6.2.5.2. Proliferationsindex, PCNA.....	55
6.2.6. Laborchemische Parameter	56
6.2.6.1 Leberenzyme.....	56
6.2.6.2 Zytokine	56
6.2.6.2 Transhepatische TNF-alpha-Passage.....	58
7. Diskussion	59
7.1. Diskussion von Material und Methoden.....	60
7.1.1. Chirurgische Präparation und Tumorimplantation.....	60
7.1.2. Isolierte hepatische Perfusion (IHP)	61
7.1.3. Hepato-arterielle Infusion (HAI).....	62
7.1.4. Tumornekrosefaktor-alpha.....	64
7.1.5. Untersuchungsmethoden.....	65

7.2. Diskussion der Ergebnisse	67
7.2.1. Isolierte hepatische Perfusion	67
7.2.2. Hepato-arterielle Infusion	69
7.3. Schlussfolgerung.....	71
8. Abkürzungsverzeichnis.....	73
9. Literaturverzeichnis	76
10. Danksagung	89
11. Lebenslauf	90

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1. Isolierte hepatische Perfusion und hepato-arterielle Infusion von TNF- α in einem Metastasenmodell der Rattenleber

Mit einer Inzidenz von nahezu 50.000 Patienten pro Jahr ist das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Tumorentität in Deutschland. Viele der Patienten weisen im Verlauf der Erkrankung Lebermetastasen auf, die eine bedeutende klinische Herausforderung darstellen. Die Therapieoptionen sind in diesen Fällen limitiert. Neben chirurgischer Resektion stellen lokal ablativ Verfahren und die Durchführung einer systemischen Chemotherapie weitere Behandlungsmöglichkeiten dar. Die isolierte hepatische Perfusion (IHP) oder hepato-arterielle Infusion (HAI) von TNF- α konnten ebenfalls in einigen Studien ihren Nutzen belegen. Allerdings sind die Wirkmechanismen des Tumornekrosefaktors in einem solchen Setting nach wie vor nicht vollständig geklärt. Die vorliegende Studie wurde daher zur Aufschlüsselung eben dieser Mechanismen, vor allem zur Analyse der Bedeutung der Mikrozirkulation durchgeführt. Es wurde untersucht ob eine lokale TNF- α -Applikation über IHP oder HAI zu einer selektiven Beeinträchtigung der Tumormikrozirkulation und damit des Metastasenwachstums führen kann.

Zu diesem Zweck wurde eine TNF- α -basierte IHP bzw. HAI, elf Tage nach Implantation von 5×10^5 CC531 Zellen eines kolorektalen Karzinoms in den linken Leberlappen von WAG/Rij-Ratten, durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten jeweils NaCl-behandelte Tiere.

Die IHP wurde über 20 Minuten mit 20 μ g TNF- α (n=7) oder NaCl (n=7) durchgeführt. Anschließend erfolgte ein 10 minütiger Wash-out. Die HAI hingegen dauerte 10 Minuten mit Dosierungen von 30 μ g/kg KG TNF- α (n=7) oder 15 μ g/kg KG TNF- α . Eine NaCl-Infusion wurde als Kontrolle durchgeführt (n=7). Die Mikrozirkulation der Leber und des Tumors wurde in einer dreistündigen Nachbeobachtungszeit mit intravitaler Fluoreszenzmikroskopie in vivo untersucht. Anschließend wurden Blut zur Bestimmung der pro-inflammatorischen Zytokinantwort und Gewebe zur histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitung asserviert.

Die TNF- α IHP bewirkte eine selektive Reduktion der Perfusion in den Tumorkapillaren. Dieser Effekt konnte 30min nach Reperfusion (TNF- α : $67 \pm 5\%$ vs NaCl: $4 \pm 1\%$; $p < 0.05$) erstmalig beobachtet werden und blieb über den gesamten Zeitraum der Nachuntersuchung persistent. Interessanterweise war die sinusoidale Perfusion des

benachbarten Lebergewebes davon nicht betroffen ($5\pm 2\%$ vs $4\pm 2\%$). Der TNF- α -induzierte Verschluss der Tumorkapillaren war mit einem Abfall der erythrozytären Flussgeschwindigkeit in den Tumorvenolen ($0.33\pm 0.08\text{mm/s}$ vs $0.69\pm 0.14\text{mm/s}$; $p<0.05$) assoziiert. Zudem zeigte sich eine pro-inflammatorische Zytokinantwort mit Anstieg von IL-6 und zeitgleich vermindertem IL-10 im Serum. Diese Ergebnisse waren von einer verstärkten Leukozyten-Endothel-Zellinteraktion in den Tumorgefäßen ($639\pm 122\text{mm}^2$ vs $318\pm 44\text{mm}^2$; $p<0.05$) und einem Caspase-3-abhängigen apoptotischen Zelltod (36.1 ± 9.2 Zellen/HPF vs 11.7 ± 1.3 Zellen/HPF, $p<0.05$) begleitet.

Vergleichbare Ergebnisse fanden sich auch bei der TNF- α -basierten HAI. Diese bewirkte eine dosisabhängige, selektive Reduktion der Mikrozirkulation des Tumors. Der Effekt konnte schon zu Beginn der Infusion beobachtet werden ($30\mu\text{g/kg KG TNF-}\alpha$: $43\pm 11\%$ vs $15\mu\text{g/kg KG TNF-}\alpha$: $36\pm 9\%$ vs NaCl: $5\pm 2\%$; $p<0.05$) und stieg während der Nachbeobachtungsphase sogar noch weiter an. Wiederum zeigten die Sinusoide der benachbarten Leber keinen Perfusionsausfall ($3\pm 3\%$ vs $0\pm 0\%$ vs $2\pm 1\%$). Die Zytokinantwort zeigte sich in einer erhöhten TNF- α -Ausschüttung bei verminderter IL-8-Serumkonzentration. Erstaunlicherweise war in der niedriger dosierten Versuchsgruppe eine verstärkte Leukozytenadhärenz zu beobachten ($438\pm 88\text{mm}^{-2}$ vs $654\pm 131\text{mm}^{-2}$ vs $170\pm 75\text{mm}^{-2}$; $p<0.05$). Letztlich induzierte die reduzierte Mikroperfusion einen selektiven apoptotischen Tumorzelltod (11 ± 2 vs 12 ± 2 vs 2 ± 1 , $p<0.05$).

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass eine TNF- α -basierte IHP oder HAI eine selektive Störung der Tumormikrozirkulation induziert, die am ehesten für die Apoptose der Tumorzellen verantwortlich ist. Beide Modelle sind an der Ratte ohne wesentliche systemische Nebenwirkungen durchführbar, wobei die HAI technisch einfacher durchzuführen ist.

2. ABSTRACT

2.1. Isolated hepatic perfusion and hepatic arterial infusion of TNF- α in a rat liver metastasis model

The colorectal carcinoma is the second most malignancy in Germany with an incidence of nearly 50.000 patients per year. Many of the patients show metastases confined to the liver, which are still a significant clinical problem. The therapeutic options in those cases are limited. Possibilities to treat those patients are surgical resection, local ablative techniques and chemotherapy. Also, the isolated hepatic perfusion (IHP) and/or hepatic arterial infusion (HAI) of TNF- α are known to induce tumor destruction. The mechanisms of action, however, are still not completely understood. Accordingly the aim of the present study was to evaluate the effect of TNF- α , especially on the microvascular level. By this, we studied whether a regional administration of TNF- α exerts selective effects on hepatic tumour microcirculation.

Therefore an in situ TNF- α IHP or HAI was performed eleven days after hepatic implantation of 5×10^5 CC531 colorectal cancer cells in the left liver lobe of WAG/Rij rats. Saline-treated animals were used as controls.

The IHP was performed for 20min with either 20 μ g TNF- α (n=7) or saline only (n=7) and was followed by a 10min wash-out. HAI was performed for 10min with either 30 μ g/kg bw TNF- α (n=7) or 15 μ g/kg bw TNF- α . Infusion of saline only served as control (n=7). The hepatic microcirculation was analyzed in vivo by quantitative multi-fluorescence microscopy over a 3-h post-reperfusion period. Other parameters of investigation were plasma concentrations of cytokine and liver enzyme as well as markers for cellular damage, apoptosis and proliferation in liver- and tumor tissue.

TNF- α -based IHP resulted in a selective shutdown of tumor capillary perfusion, which was initiated during the early 30-min post-IHP reperfusion (TNF- α : $67 \pm 5\%$ vs saline: $4 \pm 1\%$; $p < 0.05$) and was found persistent over the entire observation period. Of interest, TNF- α did not affect sinusoidal perfusion of the tumor neighbouring liver tissue ($5 \pm 2\%$ vs $4 \pm 2\%$). The TNF- α -induced occlusion of tumor capillaries was associated with an additional decrease of RBC velocity in tumor venules (0.33 ± 0.08 mm/s vs 0.69 ± 0.14 mm/s; $p < 0.05$). Further, we detected an overall pro-inflammatory cytokine response with increased IL-6 and decreased IL-10 serum concentrations. This was accompanied by an aggravation of leukocyte-endothelial cell interactions in tumor venules (639 ± 122 mm² vs 318 ± 44 mm²; $p < 0.05$) and a

caspase-3-dependent apoptotic cell death (36.1 ± 9.2 cells/HPF vs 11.7 ± 1.3 cells/HPF, $p < 0.05$).

Almost similar to the IHP-findings, the TNF- α -based HAI resulted in a dose-dependent selective shutdown of tumor capillary perfusion initially during the HAI procedure ($30 \mu\text{g/kg}$ bw TNF- α : $43 \pm 11\%$ vs $15 \mu\text{g/kg}$ bw TNF- α : $36 \pm 9\%$ vs saline: $5 \pm 2\%$; $p < 0.05$) which was found aggravating over the rest of the observation period. Again, there was no effect on sinusoidal perfusion of the tumor neighbouring liver tissue ($3 \pm 3\%$ vs $0 \pm 0\%$ vs $2 \pm 1\%$). The cytokine response showed an increased endogenous TNF- α -release but decreased IL-8 serum concentrations. Interestingly, the aggravation of leukocyte-endothelial cell interaction in tumor venules was more pronounced at the lower TNF- α dose ($438 \pm 88 \text{mm}^2$ vs $654 \pm 131 \text{mm}^2$ vs $170 \pm 75 \text{mm}^2$; $p < 0.05$). The deterioration of the microcirculation was associated with caspase-3-dependent apoptotic cell death (11 ± 2 vs 12 ± 2 vs 2 ± 1 , $p < 0.05$) as seen in the IHP-model.

Thus, we found that TNF- α -based IHP and HAI induce a selective deterioration of the tumor microcirculation, which may represent the cause for the increased apoptotic cell death. Both models are feasible without deleterious side effects, although the HAI seems to be easier to realize from a technical point of view.

3. EINLEITUNG

3.1. Klinischer Hintergrund

3.1.1. Kolorektales Karzinom

Maligne Tumorerkrankungen stellen nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. In Deutschland betrug die Inzidenz bösartiger Erkrankungen während der letzten Jahre bei Frauen ca. 300, bei Männern ungefähr 400 pro 100 000 Einwohner. Die Mortalität lag bei der weiblichen Bevölkerung bei etwa 170 und bei der männlichen bei rund 250 pro 100 000 Einwohner.

Statistische Erhebungen der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass das kolorektale Karzinom die häufigste Krebstodesursache noch vor Lungen- und Brustkrebs in der Bundesrepublik Deutschland darstellt. Mit steigender Tendenz werden pro Jahr etwa 50.000 Neuerkrankungen registriert. Rund 30.000 Patienten versterben jährlich an den Folgen des Karzinoms [Vogl et al., 2002]. In den USA liegt die Inzidenz bei durchschnittlich 140.000 Neuerkrankungen und ca. 55.000 Todesfällen. Insgesamt ist es das vierthäufigste Karzinom in der westlichen Welt [Konopke and Saeger, 2003].

Das kolorektale Karzinom tritt erblich und sporadisch auf, wobei die sporadische Form wesentlich häufiger ist. Die beiden erblichen Formen sind das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) und die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP). Bezüglich der Ätiologie und Pathogenese spielen die Nahrungszusammensetzung und andere Umweltfaktoren eine wichtige Rolle.

3.1.2. Lebermetastasen

Im Verlauf maligner Tumorerkrankungen werden in bis zu 50% aller Fälle Lebermetastasen beobachtet. Die Leber stellt somit die häufigste Lokalisation für Organmetastasen dar. Das kolorektale Karzinom bildet hier keine Ausnahme. Durch hämatogene Streuung über die Pfortader entstehen bei dieser Tumorentität hepatische Metastasen [Weiss et al., 1986]. Konopke und Saeger berichten, dass die Hälfte der Patienten im Laufe dieser Erkrankung Lebermetastasen entwickeln [Konopke and Saeger, 2003]. Andere Autoren gehen gar davon aus, dass annähernd 60% aller Patienten mit kolorektalem Karzinom von einer Metastasierung in das Lebergewebe betroffen sind [Cohen and Kemeny, 2003]. So haben bereits bei Erstdiagnose des Karzinoms ca. 14-25% der Patienten synchrone hepatische Metastasen. Nach primärer Operation mit kurativer Intention treten bei 30-40% des Patientenguts metachrone Metastasen auf [Flieger et al., 2004]. Bei ca. 40% der an einem kolorektalen Tumor Erkrankten ist die Leber der einzige Metastasierungsort. Ohne Therapie

beträgt die mediane Überlebensrate bei Patienten mit Lebermetastasen etwa 10 Monate. Zumeist ist ein Leberversagen durch die hepatische Streuung des Malignoms die Todesursache [Konopke and Saeger, 2003].

3.1.3. Leberresektion

Durch chirurgische Intervention mit Resektion ist bei isolierter Metastasierung eine Chance auf definitive Heilung gegeben [Scheele et al., 2001; Cohen and Kemeny, 2003]. Einige Untersuchungen zeigten 5-Jahresüberlebensraten von 25–30% und 10-Jahresüberlebensraten von bis zu 22% [Nordlinger et al., 1996; Jamison et al., 1997; Fong et al., 1999]. Unter Beachtung der funktionellen hepatischen Reserve sind Resektionen von 60–70% des Gesamtlebervolumens durchführbar [Lee and Hwang, 2005]. Die Letalität liegt bei diesen Eingriffen – in Abhängigkeit von der Erfahrung des Operateurs - unter 5% [Song et al., 2005]. Jedoch kommen Aufgrund verschiedener Faktoren wie Größe, Anzahl und Lokalisation der Metastasen oder Begleiterkrankungen nur etwa 10–25 % der Patienten für eine Resektion der Metastasen in Frage [Rees and John, 2001; Schlag et al., 1999; Sharpe et al., 2005].

Somit stellt die Behandlung der Patienten mit irresektablen Leberherden ein ernstes klinisches Problem dar. Bei inoperablen Metastasen sind der Allgemeinzustand, das Ausmaß des Leberbefalls, Laborparameter und Sitz des Primärherdes maßgeblich für die Prognose. So können bei Patienten mit optimalen Vorraussetzungen Einjahresüberlebensraten von 46% erreicht werden. Des weiteren ist eine Palliation durch Verfahren der Chemotherapie sowie ablativen Methoden möglich [Konopke and Saeger, 2003].

3.1.4. Systemische Chemotherapie

Die systemische Gabe von Chemotherapeutika wie Fluorouracil, Irinotecan, Leucovorin, Oxaliplatin, Bevacizumab, oder Cetuximab ist nach wie vor der Goldstandard in der Behandlung irresektabler hepatischer Metastasen [Douillard et al., 2003; Kelly and Goldberg, 2005].

In einer retrospektiven Studie berichteten Adam et al. über 701 als irresektabel eingestufte Patienten, die mit Oxaliplatin, 5-FU und Leucovorin behandelt worden waren. Bei rund 14 % dieser Patientengruppe konnte ein signifikantes Ansprechen erzielt werden, welches interessanterweise dazu führte, dass nach der Chemotherapie eine sekundäre Resektion ermöglicht wurde. Die 5-Jahresüberlebensrate betrug 34% [Adam et al., 2001]. Durch neoadjuvante Therapie ist es also möglich primär inkurable Patienten in eine prognostisch günstigere Gruppe zu überführen. Jedoch liegt die mediane Überlebensrate trotz aggressiver systemischer Chemotherapie in der Patientenpopulation mit nicht resezierbaren

Metastasen nur zwischen 12 und 18 Monaten [Weinreich and Alexander, 2002]. Angesichts dieser Zahlen gilt es nach Alternativen zu suchen.

3.1.5. Nichtoperative Ablationsverfahren

Es gibt derzeit verschiedenste weitere Behandlungsstrategien bei irresektablen Lebermetastasen, wie die lokale Tumordestruktion, welche in Form von thermoablativen Verfahren wie der hypothermen Kryotherapie [Weaver et al., 1998; Zhou et al., 1988] oder in der hyperthermen Variante als Radiofrequenzablation (RFA) beziehungsweise laserinduzierte Thermotherapie (LITT) Anwendung findet [Albrecht et al., 1996; Germer et al., 2005; Pereira et al., 2003].

Im Allgemeinen werden die nichtoperativen Ablationsverfahren, im Gegensatz zur Leberresektion, als rein palliative Therapiestrategien betrachtet [Birth et al., 2005]. Germer et al. legten dagegen Daten vor, die bei selektierten Patienten vergleichbare Ergebnisse mit denen der Resektion zeigten [Germer et al., 2005]. Es zeigt sich also, daß der Stellenwert lokal ablativer Verfahren gegenwärtig noch nicht eindeutig geklärt ist.

3.2 Regionale Chemotherapie

3.2.1. Isolierte Perfusion

Die Idee einer lokalen Chemotherapie, die einzig am betroffenen Gewebe ansetzt, ist in der isolierten Organperfusion verwirklicht. Im Gegensatz zur systemischen Chemotherapie erfolgt die Medikamentenapplikation selektiv in das betroffene Gewebe. Das Organ wird vaskulär vollständig isoliert und anschließend perfundiert. So ist es möglich selbst toxisch wirkende Stoffe zu applizieren, bzw. mit Dosierungen zu arbeiten, welche als Gabe bei der konventionellen intravenösen Chemotherapie aufgrund unerwünschter Begleitwirkungen nicht anwendbar wären [Vahrmeijer et al., 1998]. Bei kompletter Isolation lassen sich systemische Nebenwirkungen nahezu vollständig vermeiden. Die Methode der isolierten Perfusion basiert also auf einfachen pharmakologischen Prinzipien und erweitert die therapeutischen Möglichkeiten in der Behandlung von Malignomen verschiedener Organe. Es gibt Berichte über die Anwendung an der Lunge bei pulmonalen Metastasen [Hendriks and Van Schil, 1998], an der Niere bei Nierenzellkarzinomen [Walther et al., 1996] und insbesondere bei Tumoren der Extremitäten [Bickels et al., 1999; de Wilt et al., 1999; Eggermont et al., 1996; Lienard et al., 1998; Manusama et al., 1996].

Gerade die isolierte Extremitätenperfusion (isolated limb perfusion, ILP) zeigt in vielen Publikationen positive Ergebnisse. Mit Kombination von Melphalan und Tumornekrosefaktor- α hat sich dieses Verfahren bei der Behandlung von Melanomen und Weichteilsarkomen heute aufgrund seiner hohen Ansprechrate etabliert. Die Arbeitsgruppe

um Eggermont berichtete in einer jüngst veröffentlichten Metaanalyse über die Ergebnisse verschiedener Studien. Bei alleiniger Gabe von Melphalan wurden bei Melanomen der Extremitäten Ansprechraten von 40%–82% erzielt. Durch die Zugabe von TNF- α konnte das Ansprechen auf 59%-89% gesteigert werden. Die Autoren stellen fest, dass die ILP mit TNF- α gerade bei Patienten mit hoher Tumorlast die effizienteste Behandlungsmethode sei [Grünhagen et al., 2006b]. In einer zweiten Publikation konnten sie zeigen, dass Ähnliches auch für die Behandlung von Sarkomen mit einer ILP gilt. In zwölf Jahren behandelten sie 197 Patienten mit Weichteilsarkomen der Extremitäten. Es wurden 217 ILPs mit jeweils 1mg–4mg TNF- α und 10mg–13mg/L Melphalan durchgeführt und analysiert. Man fand eine Ansprechrate von 75% und konnte in 87% der Fälle eine Amputation der Gliedmaßen verhindern [Grünhagen et al., 2006a]. Ähnliche Ergebnisse in den Perfusionsmodellen anderer Organe und Tumorentitäten bleiben abzuwarten. Insgesamt ist festzuhalten, dass eine isolierte Organperfusion, wenn sie mit vernachlässigbar minimierter Leckage in die Peripherie und vertretbarer lokaler Toxizität durchgeführt wird, als seriöse Therapieoption in der Behandlung von Malignomen betrachtet werden muss [Thorlacius et al., 2001].

3.2.2. Isolierte hepatische Perfusion (IHP)

Die Leber, als häufigste Metastasenlokalisation ist allein aufgrund ihrer anatomischen Verhältnisse ein nahezu ideales Organ um eine isolierte Perfusion durchzuführen [Ku et al., 2002]. Literatur zur isolierten Leberperfusion (Isolated hepatic Perfusion, IHP) gibt es bereits aus den 1950er und 1960er Jahren [Creech, Jr. et al., 1958; Healey et al., 1961]. Die Autoren berichteten zunächst, dass eine Isolation der Leber vom restlichen Körperkreislauf durchführbar sei und die Perfusion mit einem chemotherapeutischen Agens gut toleriert würde. Die erste klinische Anwendung wurde 1961 von Ausmann beschrieben [Ausmann, 1961]. Er behandelte fünf Patienten mit Nitrogensenf und zeigte, dass es zu keinen schweren toxischen Nebenwirkungen kommt. Etwas später untersuchte Kinoshita hämodynamische und biochemische Auswirkungen der IHP am Kaninchen-Modell [Kinoshita, 1968] und behandelte drei an einem primären Leberkarzinom erkrankte Patienten mit der isolierten Perfusion. Es folgten bis heute weitere klinische wie auch tierexperimentelle Studien zur IHP. Dabei wurden verschiedene Perfusionsmodelle angewandt. Neben dem offenen Modell mit Laparotomie, veno-venösem Bypass und extrakorporaler Perfusionspumpe (IHP) gibt es weniger invasive perkutane Zugänge mit verschiedenen Kathetersystemen (Percutaneous isolated hepatic perfusion, PIHP oder isolated hypoxic hepatic perfusion, IHHP) [Ku et al., 2002; Nakamoto et al., 2000a]. Man behandelte unterschiedliche Tumorentitäten, wie das hepatozelluläre Karzinom oder Metastasen des okulären Melanoms und des colorektalen Karzinoms. Des weiteren untersuchte man verschiedene Chemotherapeutika und Additiva. Neben 5-Fluorouracil [Aigner et al., 1982], Melphalan und Cisplatin [Hafstrom et al., 1994] sowie Mitomycin C [Marinelli et al., 1991] fand auch Tumornekrosefaktor alpha Anwendung

[Alexander et al., 1998]. Außerdem evaluierte man den Nutzen von hyperthermen und hypoxischen Bedingungen während der Perfusion [Skibba and Quebbeman, 1986].

Gerade in den 1980er und 1990er Jahren wurden demnach viele klinische Studien zu diesem Thema begonnen. Zu dieser Zeit waren insbesondere die Resultate der Behandlung von Lebermetastasen des colorektalen Karzinoms mit einer systemischen 5 FU/-Leukovorin Chemotherapie mit Ansprechraten von nur 20% und einem medianen Überleben von etwa 12 Monaten ernüchternd [Advanced colorectal cancer meta-analysis project, 1992; Meta-analysis group in cancer, 1998]. Zudem mehrten sich Publikationen über die vielversprechenden Ergebnisse der isolierten Extremitätenperfusion (ILP), welche die Hoffnung nährten auch andere isolierte Perfusionsmodelle erfolgreich durchführen zu können.

Im Falle der Leberperfusion zeigte sich jedoch, dass die IHP schon allein aufgrund ihrer chirurgischen Komplexität und der damit verbundenen Morbidität und Mortalität ein aggressives, risikoreiches und auch teures Verfahren ist. Vor diesem Hintergrund betrachteten viele Kliniker die IHP als rein experimentellen Ansatz in der Therapie von Lebertumoren. Einige der Studien aus verschiedenen spezialisierten Zentren zeigten dennoch vielversprechende Resultate.

Die erste größere Studie wurde 1987 von Schwemmler et al. vorgestellt. Die Autoren berichteten über ein Kollektiv von 50 Patienten mit Metastasen eines colorektalen Karzinoms die sie mit einer IHP mit 5-FU/MMC/Cisplatin behandelten. Sie erzielten darunter in 22% der Fälle eine komplette Remission und bei 68% der Patienten eine partielle Remission. Das mediane Überleben in dieser Population lag bei 14 Monaten [Schwemmler et al., 1987]. Im Gegensatz dazu präsentierten Hafström et al. 1994 Ergebnisse von einer hyperthermen IHP bei 29 Patienten mit differierenden malignen Lebererkrankungen und einer Ansprechrates von lediglich 20% sowie einer Mortalitätsrate von 14% [Hafstrom et al., 1994]. 1998 konnten Oldhafer et al. Daten von 6 Patienten vorlegen die mit einer Kombination von Melphalan und Cisplatin behandelt wurden. In dieser Studie gab es keine behandlungsassoziierte Mortalität und 2 der 6 Patienten zeigten eine Tumorregression von bis zu 50% [Oldhafer et al., 1998].

Auch aufgrund der beeindruckenden Ergebnisse der ILP setzte sich Melphalan um diese Zeit als Zytostatikum bei der IHP zunehmend durch. Es war bekannt, dass alkylierende Substanzen eine steile Dosis-Wirkungs-Beziehung haben und daher gut für die relativ kurze Expositionszeit am Tumorgewebe bei der IHP geeignet sind [Vahrmeijer et al., 1998]. Melphalan wurde alleine oder in Kombination mit TNF- α appliziert. Durch die zusätzliche Applikation von Tumornekrosefaktor versprach man sich eine Potenzierung des antitumorösen Effektes. Wie oben erwähnt arbeiteten auch Alexander et al. mit TNF- α und Melphalan. 1998 präsentierten sie eine klinische Studie mit 34 Patienten, die einer 60minütigen hyperthermen IHP mit TNF- α (1,0mg) und Melphalan (1,5mg/kg KG) unterzogen wurden. Das Resultat war eine Ansprechrates von insgesamt 75% ohne

perioperative Mortalität. Ein Patient verstarb jedoch postinterventionell [Alexander et al., 1998]. In weiteren, vielbeachteten klinischen Studien konnten Alexander et al. zeigen, dass die IHP, bei akzeptabler Mortalität und Morbidität, eine hohe Tumorresponse hat [Alexander et al., 2000a; Alexander et al., 2000b; Alexander et al., 2002; Alexander et al., 2005].

Ebenso wurden tierexperimentelle Studien durchgeführt. Borel Rinkes et al. vom Cancer Center in Rotterdam erarbeiteten ein Modell am Schwein und stellten fest, dass es bei den biochemischen und histologischen Untersuchungen post perfusionem zu geringfügigen Störungen der Leberstruktur und -funktion kam [Borel, I et al., 1997]. Aus dem gleichen Institut stammt eine Arbeit über eine IHP mit TNF- α und Melphalan bei einem BN-175 Ratten-Sarkom-Modell. Hier verzeichneten die Autoren durch die Zugabe von TNF- α einen dramatischen Anti-Tumor-Effekt ausgedrückt durch eine Reduktion der Tumormasse. Bei Applikation von nur einem der beiden Stoffe fanden sie eher eine Zunahme des Tumolvolumens im Beobachtungszeitraum [van Ijken et al., 2000].

Trotz dieser Untersuchungen ist die Datenlage insgesamt weder klinisch noch experimentell ausreichend um den Stellenwert der IHP gegenwärtig exakt einschätzen zu können.

3.2.3. Hepato-arterielle Infusion (HAI)

Eine alternative Therapieoption ist die regionale Chemotherapie mittels hepato-arterieller Infusion (HAI). Hierbei handelt es sich im Vergleich zur IHP um einen offenen Kreislauf. Das Modell der HAI basiert auf verschiedenen Prinzipien, welche in einer Arbeit von Cohen und Kemeny veranschaulicht sind [Cohen and Kemeny, 2003]. Zum einen berichten die Autoren über die oben bereits angeführten Tatsache, dass die Leber via portaler Zirkulation den wichtigsten Metastasierungsort für das kolorektale Karzinom und andere gastrointestinale Tumore darstellt und des weiteren die Möglichkeit einer Metastasierung per continuitatem gegeben ist. Von der HAI erhofft man sich durch direkte und lokale Therapie eine Ausbreitung der Metastasen zu verhindern. Zum anderen weiss man, dass der Blutzufuss bei Leberherden ab einer Größe von >3mm im Prinzip vollständig der Arteria hepatica entstammt, während die Perfusion der restlichen Leber vornehmlich von der Vena Porta geleistet wird [Breedis and Young, 1954]. Daraus ergibt sich, dass bei Infusion über den arteriellen Zugang zur Leber, hohe Konzentration des applizierten Stoffes insbesondere im Tumorgewebe erreicht werden können, wobei das restliche Leberparenchym weitestgehend ausgespart bleibt. Außerdem kann durch den first-pass-Mechanismus der Leber und die damit verbundene Extraktion des Medikaments aus der arteriellen Zirkulation die systemische Toxizität niedrig gehalten werden.

Die Ursprünge dieses therapeutischen Ansatzes lassen sich bis in die 60er Jahre des vergangenen Jahrhunderts zurückdatieren. 1964 behandelten Sullivan et al. 16 Patienten,

welche Lebermetastasen gastrointestinaler Malignome aufwiesen mit einer HAI. Zehn dieser Patienten sprachen objektiv auf die Therapie an und wiesen einen klinischen Benefit auf [Sullivan et al., 1964]. In den Anfängen der HAI wurden die Katheter operativ oder perkutan in der A. hepatica platziert und an eine externe Infusionspumpe angeschlossen. Diese Methode war allerdings mit einer hohen Komplikationsrate in Form von Thrombosierung, Infektion, Blutungen und Katheterdislokationen assoziiert [Ensminger, 2002]. Demnach ging man in der Folge dazu über subkutane Portsysteme zu verwenden, die aber ebenso mit einer hohen Fehlerrate behaftet waren [Doci et al., 1990; Wickremesekera et al., 2000]. In den späten 1970er Jahren wurden dann erstmals implantierbare Infusionspumpen entwickelt, wodurch die Therapiekomplicationen deutlich regredient waren. Aktuelle Daten stammen aus der Arbeit von Cohen und Kemeny. Die beiden Autoren werteten in einer Metaanalyse Studien von 1987 bis 2003 aus. Sie konnten für unterschiedliche Therapieregime der HAI jeweils Vorteile in Bezug auf die Ansprechrate sowie auf die 2-Jahresüberlebensrate im Vergleich zur i.v. Chemotherapie zeigen. Außerdem geben die Autoren einen Ausblick auf weitere Ansatzmöglichkeiten der arteriellen Infusion wie etwa die Kombination von HAI mit systemischer Chemotherapie oder die Verwendung neuer Chemotherapeutika wie zum Beispiel Irinotecan oder Oxaliplatin [Cohen and Kemeny, 2003]. Frühere Metaanalysen sind zurückhaltender und fanden einen nur geringen Vorteil der HAI gegenüber der konventionellen intravenösen Chemotherapie [Harmantas et al., 1998]. Es gibt demnach eine ständige Progression in der Entwicklung dieses Verfahrens und seiner verschiedenen Kombinations- und Anwendungsmöglichkeiten.

Eine weitere interessante Möglichkeit bietet die arterielle Infusion von TNF- α . So konnte gezeigt werden, dass in Patienten mit Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms, welche auf andere Chemotherapien kein Ansprechen mehr zeigten, unter einer TNF- α -Infusion über einen angiographisch via Arteria femoralis in der Arteria hepatica platzierten Katheter eine Tumorregression erzielt werden kann [Mavligit et al., 1992]. Ferner wies die Arbeitsgruppe um Mavligit in ihrer Studie nach, dass es bei 50% der durch HAI mit TNF- α behandelten Patienten in der Nachsorge zu einem signifikanten Abfall (>25%) des carcinoembryonalen Antigens kam, welches als Tumormarker für das kolorektale Karzinom fungiert. Insgesamt kam man zu der Erkenntnis, dass eine regionale Chemotherapie in Form einer HAI mit TNF- α als sicher für die Patienten und die auftretenden Nebenwirkungen als akzeptabel zu beurteilen sind.

3.3. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)

3.3.1. Historie

Schon über ein Jahrhundert ist ein antitumoröser Effekt von bakteriellen Toxinen bekannt. 1893 behandelte W.B. Coley Tumorpatienten mit wiederholten Injektionen eines Erysipeltoxins [Coley, 1893]. Diese Idee wurde Mitte des vergangenen Jahrhunderts erneut aufgegriffen und es gelang im Tiermodell den Antitumor-Effekt nachzuweisen [Havas et al., 1958; Shear, 1941]. 1975 konnte erstmals ein Mediator isoliert werden, der eine Lipopolysaccharid-induzierte Nekrose in Tumoren von Mäusen bewirkte. Man gewann ihn aus dem Serum von bacille-Calmette-Guerin-infizierten Mäusen und injizierte ihn in tumortragende Tiere. Das Resultat war eine massive hämorrhagische Nekrose des Tumors. Entsprechend nannten die Entdecker ihr Zytokin Tumornekrosefaktor [Carswell et al., 1975]. In vitro konnte man eine zytostatische bzw. -lytische Aktivität nachweisen. Später zeigte sich, dass der Tumornekrosefaktor identisch mit dem von Beutler entdeckten Kachektin ist, welches eine Kachexie zu induzieren vermochte [Beutler et al., 1985; Beutler and Cerami, 1986]. Letztlich gelang es die komplette Aminosäuresequenz von Tumornekrosefaktor / Kachektin zu entschlüsseln und das Zytokin erfolgreich in Escherichia Coli zu exprimieren [Aggarwal et al., 1985; Pennica et al., 1984]. Seither wurde rekombinanter Tumornekrosefaktor (rTNF) in grossen Mengen hergestellt. Zur Unterscheidung von Lymphotoxin, einem lymphozytär gebildeten Zytokin, erhielt dieser TNF den Zusatz alpha (TNF- α) und das Lymphotoxin den Zusatz beta (TNF- β).

3.3.2. Physiologie und Biochemie

Humanes TNF- α ist ein 157 Aminosäuren großes nicht glykosyliertes Trimer mit 2 Cystein-Resten an Position 69 und 101. TNF- α ist ein zentraler Faktor des septischen Schocks, hat stark proinflammatorische Eigenschaften und steuert mit anderen Mediatoren die Entwicklung und die Antwort des Immunsystems [Bazzoni and Beutler, 1996]. Es wird im Wesentlichen von Makrophagen bzw. Monozyten aber auch von Lymphozyten und Mastzellen, zum Beispiel nach Stimulation durch inflammatorische Reize wie Lipopolysaccharide, produziert. TNF- α ist ein Transmembranprotein, welches nach Aufspaltung durch eine Metalloprotease (TACE, TNF alpha converting enzyme) in einer löslichen und einer membranständigen Form existiert. Beide Isoformen binden an zwei bestimmte ubiquitär vorkommende Rezeptoren: Den p55 bzw. TNF-R1 und den p75 oder TNF-R2-Rezeptor. Die intrazellulären Signalwege über den TNF-R1 sind zu grossen Teilen entschlüsselt. In Untersuchungen an Endothelzellen wurden zwei gegensätzliche Mechanismen gefunden: Zum einen induziert es Apoptose, was mit einer Caspaseaktivierung einhergeht und zum anderen wirkt es proliferativ über die Aktivierung des nukleären Faktors NF- κ B [Hsu et al., 1996; Rath and Aggarwal, 1999; Song et al., 1997]. In Tumorzellen konnte

außerdem ein Caspase- und Cytochrom-C-unabhängiger Weg zur Zelltod-Induktion gefunden werden. In einer Studie an Mäusen fand man, dass rekombinantes humanes TNF- α in neu gebildeten Tumorkapillaren die Sekretion einer fibrinähnlichen Substanz induzieren kann [Shimomura et al., 1988]. Einzelne biochemische Abläufe, die der Tumorzelltoxizität und den immunologischen Veränderungen zugrunde liegen, sind demnach verstanden. Andere sind allerdings nach wie vor nur unzureichend aufgeklärt [Azémar et al., 2000].

3.3.3. Klinische und experimentelle Untersuchungen

Wie bereits in den obigen Abschnitten aufgeführt, belegen verschiedene Daten den therapeutischen Nutzen von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) bei Tumorerkrankungen. Es ist hinlänglich bekannt, dass TNF- α eine tumorderstrierende Wirkung besitzt. Der limitierende Faktor in der Anwendung von TNF sind seine Nebenwirkungen. Aufgrund dieser Tatsache wurde sein klinischer Einsatz teilweise nicht mehr fortgeführt. Die maximal tolerable Dosis liegt beim Menschen bei 150–200 μ g/m² Körperoberfläche unter zweimaliger i.v. Gabe pro Tag und damit um den Faktor 10 niedriger als antitumoral wirksame Dosen in tierexperimentellen Untersuchungen. Die gravierendsten Nebenwirkungen sind Beeinträchtigungen des Herz-Kreislauf-Systems wie Hypotonie bis hin zum Schock, aber auch Fatigue, Fieber, Nausea, respiratorische Insuffizienz und ausgeprägte lokale Reizung am Injektionsort [Azémar et al., 2000]. Wegen dieser toxischen Wirkungen spielt TNF bei der systemischen Chemotherapie kaum mehr eine Rolle. Um so mehr gilt es, seinen Nutzen in der isolierten Perfusion bzw. arteriellen Infusion genauestens zu untersuchen.

4. ZIEL DER STUDIE

4.1. Fragestellung

In der vorliegenden Studie wurden die Wirkmechanismen von rh-TNF- α 1a im Rahmen einer isolierten hepatischen Perfusion (IHP) bzw. hepato-arteriellen Infusion (HAI) an einem Lebertumormodell in WAG/Rij-Ratten untersucht. Dabei waren folgende Fragen von Interesse:

- Welches Modell (IHP vs HAI) erscheint besser durchführbar in Bezug auf technische Probleme und systemische Nebenwirkungen ?
- Führt die Gabe von TNF- α im Rahmen einer isolierten Leberperfusion oder hepato-arteriellen Infusion zu einer antitumorösen Wirkung auf Lebermetastasen ?
- Besteht ein Unterschied in bezug auf den antitumorösen Effekt zwischen den beiden Applikationsformen IHP und HAI ?
- Über welche Mechanismen wird die antitumoröse Wirkung von TNF- α vermittelt ?
- Welche Änderungen der Mikrozirkulation lassen sich in Leber und Tumor nachweisen ?
- Alteriert der Tumornekrosefaktor die gesunde Leber, oder ist seine Wirkung selektiv auf das Tumorgewebe beschränkt ?
- Ist die Wirkung des TNF- α in einem HAI-Setting dosisabhängig ?
- Ist die Dosis relevant bezüglich systemischer Nebenwirkungen ?
- Wie sieht die Zytokinantwort der TNF- α -behandelten Tiere aus ?
- Lassen sich bereits 3 Stunden post Perfusion / Infusion Apoptosen in den Hepatozyten respektive Tumorzellen nachweisen ?

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Als Versuchstiere dienten insgesamt 35 männliche WAG-Ratten (Charles River, Sulzfeld, BRD) in unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die Tiere befanden sich bis zum Versuchsbeginn unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur: 22°C, relative Luftfeuchtigkeit: 55%, $\pm 10\%$) mit einem Hell-Dunkelrhythmus von 12 Stunden in konventioneller Tierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar. Das Körpergewicht der Tiere betrug 300-350g, was einem Alter von 24-30 Wochen entsprach. Während ihrer Haltung bekamen die Versuchstiere Standardlaborfutter (Fa. Altromin, Lage, BRD) und Wasser ad libitum.

5.2. Tumor

Der verwendete Tumor CC531 (CLS; Cell Lines Service and Tumor- Cellbank; Heidelberg, BRD) war ein rattenspezifisches Kolonkarzinom. Die Zelllinien wurden bei -180°C in flüssigem Stickstoff in 1,8ml Kryogefäßen (Nunc, Roskilde, DK) konserviert. Zur Kultivierung wurden die Gefäße in 37°C temperiertem Wasser aufgetaut, die Oberfläche des Gefäßes mit 70% Isopropanol desinfiziert und anschließend in ein 50ml Zentrifugenröhrchen (Roth, Karlsruhe, BRD) mit vorgelegtem, Raumtemperatur-equilibrierten, FCS-haltigem Kulturmedium (FCS; Foetal calf serum; Gold, PAA, Cölbe, BRD) überführt. Nach zwei fünfminütigen Zentrifugationsschritten (Universal 30 F; Hettich, Tuttlingen, BRD) bei 1600U/min (400xg), wurden die Zellen in Petrischalen (Cellstar; 100/20mm, Greiner Bio-One, Frickenhausen, BRD) ausgesät und bei 37°C unter einer 5% humiden CO_2 -Atmosphäre in RPMI 1640 Medium (PAA) kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Zur Vermehrung wurden die Zellen nach Vorliegen einer Konfluenz von etwa 70-80% passagiert.

Zur Vorbereitung für die Injektion der Tumorzellen wurden diese mit 0,02% Trypsin/EDTA-Lösung (0,5g/l; 0,2g/l; Virolex; PAA) versetzt und mit dem Enzym Accutase (PAA) aus den Kulturgefäßen gelöst. Nach einer ca. fünfminütigen Inkubation bei 37°C wurde die Enzymwirkung mit FCS-haltigem Kulturmedium neutralisiert und der Zellansatz durch Zentrifugieren (5min, 1600U/min) zweimal mit PBS (Phosphat buffered solution; PAA) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation konnten die Zellen anschließend im Verhältnis 1:2 ausgedünnt und bis zur nächsten 70-80% Konfluenz kultiviert werden. Die

Zellen wurden i.d.R. in der folgenden zweiten Passage noch einmal 1:4 bis 1:5 ausgedünnt und am zweiten Tag nach Passagierung für die Experimente eingesetzt. Die Zellzählung wurde mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Leica DMIL, Solms, BRD) bei einer 100x Gesamtvergrößerung (Objektiv Leica C Plan 10x/0.22, PH1, Okkular Leica 10x/18) in einer Neubauer-Zählkammer, welche auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/20 μ l PBS eingestellt war, durchgeführt.

5.3. Tumorimplantation

Zunächst wurden die Tiere in der Bauchregion rasiert (Electra GH 204; Aesculap, Tuttlingen, BRD). Für die Tumorimplantation erhielten die Tiere in Äthernarkose (Äther für Narkose, Hoechst, Frankfurt/Main, BRD) eine mediane Laparotomie und die Tumorzellen wurden über eine feine 27G Kanüle (Omnicon F, Braun, Melsungen) unter Zuhilfenahme feuchter Wattestäbchen zur Leberfixation, subkapsulär in die dorsale Leberseite des linken Leberlappens injiziert (Abbildung 1A). Die Tumorzellzahl betrug 5×10^5 Zellen pro Injektion. Beim Herausziehen der Kanüle aus der Leber wurde die Einstichstelle mit Histoacrylkleber (Histoacryl®; Braun/Aesculap, Tuttlingen, BRD) verschlossen, um ein Nachbluten und eine Tumorzellaussaat über den Injektionskanal in das Peritoneum zu verhindern [Kollmar et al., 2004]. Anschließend wurden die Wundränder durch eine fortlaufende Hautnaht verschlossen. Nach 11 Tagen wurden die Experimente durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Tumoren eine Größe von durchschnittlich etwa 5mm im Durchmesser (Abbildung 1B).

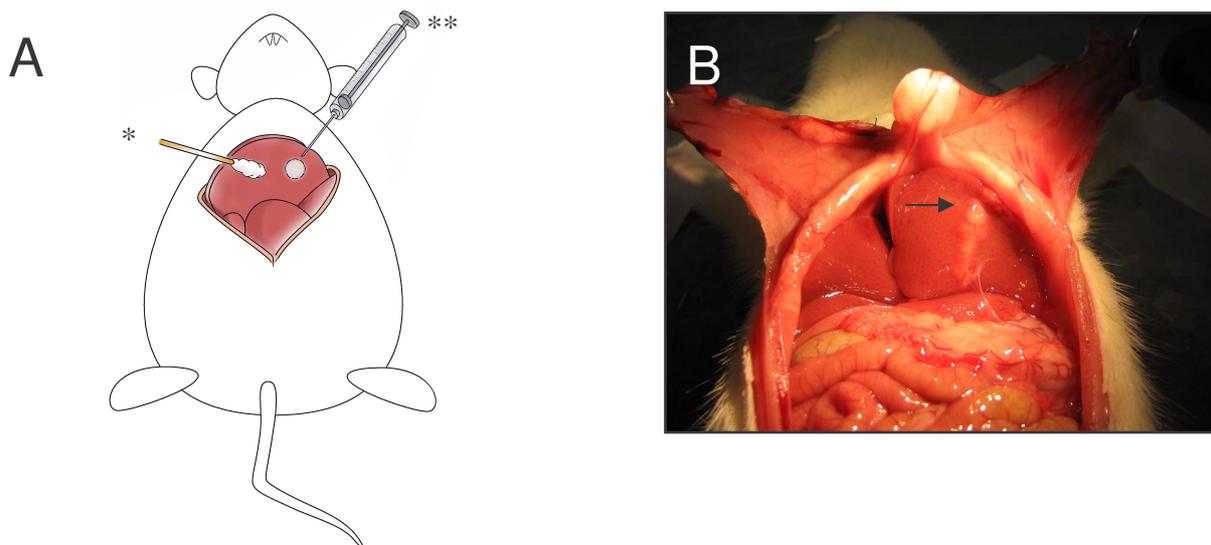


Abbildung 1A, B: 1A zeigt die Implantationstechnik. Der linke Leberlappen wurde mobilisiert und mit einem feuchten Wattestäbchen (*) in der Transversalebene aufgerichtet. Anschließend erfolgte die Injektion der Tumorzellen (**). 1B zeigt den Tumor 11 Tage nach Implantation (→).

5.4. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)

Der Tumornekrosefaktor wurde freundlicherweise von Boehringer Ingelheim GmbH zur Verfügung gestellt. Es handelte sich bei dem Präparat um BEROMUN[®] mit dem Wirkstoff Tasonermin. Tasonermin entspricht humanem Tumornekrosefaktor alpha 1a (TNF- α 1a) mit einer Aktivität von $3.0\text{--}6.0 \times 10^7$ IU.

5.5. Modell

5.5.1. Anästhesie und vorläufige chirurgische Präparation

Im Rahmen der vorliegenden Studie kamen zwei unterschiedliche Modelle (HAI, Hepatic Arterial Infusion und IHP, Isolated Hepatic Perfusion) der intrahepatischen Applikation eines spezifischen Stoffes (Tumornekrosefaktor, Natriumchlorid), über die Arteria gastroduodenalis zur Anwendung. Die Durchführung der Versuche erfolgte jeweils elf Tage nach oben beschriebener Tumorimplantation. Die Anästhesie war in beiden Modellen wie folgt:

In leichter Äthernarkose (Äther für Narkose, Hoechst, Frankfurt/Main) wurden die Tiere gewogen, woraufhin entsprechend dem Körpergewicht die intraperitoneale Applikation von Narcoren[®] (1:2 verdünnt mit NaCl, 0,1ml/100g Körpergewicht) erfolgte. Nach der Rasur von Hals- und Bauchregion (Electra GH 204; Aesculap, Tuttlingen) wurden die Tiere in Rückenlage mittels Pflasterstrips auf einem Operationstisch fixiert. Der Operationstisch bestand aus einer Metallplatte mit integriertem Heizelement (Effenberger, Pfaffing/Attel, BRD), welche per Rücksteuerung mit einer rektalen Temperatursonde erlaubte, die Körpertemperatur der Versuchstiere zwischen 36°C und 37°C konstant zu halten. Zu Beginn der Operation wurde der Halsbereich des Tieres durch einen Längsschnitt eröffnet, die Trachea freipräpariert und per Horizontalschnitt zwischen zwei Knorpelspannen inzidiert. Es folgte die Einbringung einer Trachealkanüle zur Erleichterung der Spontanatmung. Nach Darstellung der Arteria carotis communis dextra und Anschlingen des Gefäßes mit Vicryl-Fäden der Stärke 3.0 konnte über eine Inzision der Arterienwand ein spitz angeschrägter Polyethylenkatheter (PE-50, ID 0.58mm, Portex, Hythe, UK) in das Gefäßlumen eingeführt und mit den vorgelegten Fäden fixiert werden. Der arterielle Katheter bestand aus zwei Schenkeln, welche zum Zweck der Blutentnahme für die Blutbildbestimmung und arterielle Blutgasanalyse über eine vorgefertigte Kanüle miteinander verbunden waren. Am tierfernen Ende des Katheters wurde über zwei eingebrachte Dreiwegehähne (Discofix[®], Braun, Melsungen, BRD) ein Perfusor (Perfusor[®] Secura FT, Braun, Melsungen, BRD) sowie ein Blutdruckmessgerät (Servomed, Hellige, Freiburg/breisgau, BRD) angeschlossen. Die repetitive Spülung mit 0,9% Kochsalzlösung (Ecotainer[®], Braun, Melsungen, BRD) mit

10ml/kg/h verhinderte die Okklusion des Katheters durch Thrombenbildung und diente zusätzlich der Volumensubstitution. Des Weiteren konnte eine kontinuierliche Kontrolle von Herzfrequenz und arteriellem Blutdruck gewährleistet werden.

Im nächsten Schritt erfolgte die Wiedereröffnung des Situs durch die mediane Laparotomie sowie zusätzlich ein lateraler Flügelschnitt beidseits. Die dadurch entstandenen Hautsegmente wurden durch Wundhaken, welche über Magnetständer auf dem Operationstisch fixiert waren, aufgespannt, um den Situs darstellen zu können. Abschließend erfolgte eine Lösung der Leberbänder (Ligamentum falciforme hepatis, Lig. teres hepatis, Ligg. triangulare dextra und sinistra) und eine Auslagerung des gesamten Intestinums um die weitere Vorgehensweise zu erleichtern. Die so auf einer Mullkompressen zur linken Körperseite des Tieres zum Liegen kommenden Darmschlingen wurden während der Dauer des gesamten Versuches mit Kochsalzlösung befeuchtet, um ein Austrocknen zu verhindern.

5.5.2 Chirurgische Präparation des isolierten Perfusionsmodells (IHP)

Nach Durchführung der unter Punkt 5.5.1. beschriebenen Schritte erfolgte in diesem Modell die Darstellung der Vena femoralis in der linken Leiste. Die Vene wurde zum Einführen eines heparinisierten Katheters (PE-50, ID 0.58mm, Portex, Hythe, UK) inzidiert. Dieser wurde unter Kontrolle bis retrohepatisch vorgeschoben. Anschließend wurde am Ende des Katheters ein Faden (Vicryl 3-0) cranial der Vene der rechten Nebenniere für eine spätere Verschlussligatur vorgelegt. Im nächsten Schritt wurde die Arteria gastroduodenalis dargestellt und zweifach mit Seide der Fadenstärke 6-0 angeschlungen. Nach einer Inzision konnte hier ebenfalls mit einem heparinisierten Katheter (PE-50, ID 0.28mm, Portex, Hythe, UK) arteriell kanüliert und der Katheterschlauch mit den vorgelegten Fäden fixiert werden. Sowohl der venöse als auch der arterielle Katheter waren mit Dreiwegehähnen versehen, um später ein Pumpsystem anschließen zu können. Daraufhin wurde die suprahepatische Vena cava inferior, die Arteria mesenterica superior, die Arteria gastrica sinistra und die Vena porta zur Darstellung freipräpariert und angeschlungen. Vor Durchführung der Perfusion erhielten die Tiere 500IU Heparin i.v. (Heparin-Natrium, Braun).

5.5.3. Chirurgische Präparation des Infusionsmodells (HAI)

Bei diesem Modell erfolgte nach den Vorbereitungen gemäß Punkt 5.5.1. lediglich die Darstellung der Arteria gastroduodenalis, welche mit 6-0 Seide zweifach angeschlungen wurde, um sie dann über eine zuvor durchgeführte Gefäßinzision äquivalent dem Perfusionsmodell mit einem heparinisierten Katheter (PE-50, ID 0.28mm, Portex, Hythe, UK) zu kanülieren. Vor Durchführung der Infusion erhielten die Tiere 500IU Heparin i.v. (Heparin-Natrium, Braun).

5.6. Perfusion und Infusion der Leber

5.6.1. Ablauf der isolierten hepatischen Perfusion

Kurz vor Beginn der Perfusion wurden zunächst die Arteria mesenterica superior und danach die Arteria gastrica sinistra mittels feinen Bulldogklemmen geclippt. Dann wurde die Pfortader geklemmt und die Ligatur um die infrahepatische Vena cava und den darin befindlichen Katheter zugezogen. Als letzter Schritt wurde die suprahepatische Vena cava inferior mit einer feinen Kocherklemme verschlossen. Somit war eine isolierte Perfusion der Leber, mit Zufluss über die Arteria gastroduodenalis und retrogradem Abfluss über die infrahepatische Vena cava inferior gewährleistet. Nach erfolgter Gefäßklemmung startete die Perfusion.

Es wurde ein extracorporales oxygeniertes Pumpsystem verwendet. Dieses beinhaltete eine Rollerpumpe (Reglo Digital Type ISM832A, Vs 2.10) und einen doppelwandigen Glaskolben-Oxygenator (R120144), dessen äußeres Lumen über eine Wasserpumpe mit Wasser von ca. 38°C kontinuierlich gespült wurde, um die Temperatur des im inneren Lumen befindlichen Perfusats konstant halten zu können. Zusätzlich wurde das Perfusat mit einem Gemisch von O₂ : CO₂ (95% : 5%) oxygeniert. Das Kreislaufsystem wurde mit 20ml NaCl-Lösung vorgefüllt. Anschließend wurde TNF- α (20 μ g) in einer 1ml NaCl-Lösung hinzugegeben. Die Tiere in der Kontrollgruppe erhielten lediglich eine NaCl-Perfusion. Mit einer Flussrate der Rollerpumpe von 3.053ml/min konnte das Perfusat über den arteriellen Schenkel des Systems in die Leber appliziert werden. Der Rückfluss erfolgte über den venösen Teil des Systems und wurde zu Beginn der Perfusion manuell über einen Dreiwegehahn mit angeschlossener 1ml-Spritze unterstützt. Die Perfusion fand unter ständiger Kontrolle von Temperatur (ca. 37°C–38°C) und Level des Flüssigkeitsvolumens im Reservoir statt und dauerte 20 Minuten. Im Anschluss daran folgte ein Washout über 10 Minuten mit oxygeniertem NaCl. Daraufhin wurden die Gefäßclips entfernt, um eine Reperfusion der Rattenleber gemäß dem physiologischen Blutfluss wieder herzustellen. Die Katheter wurden entfernt und die entsprechenden Gefäße anschließend ligiert. Danach wurden die Tiere umgelagert und die Intravitalmikroskopie durchgeführt (Abbildung 2)

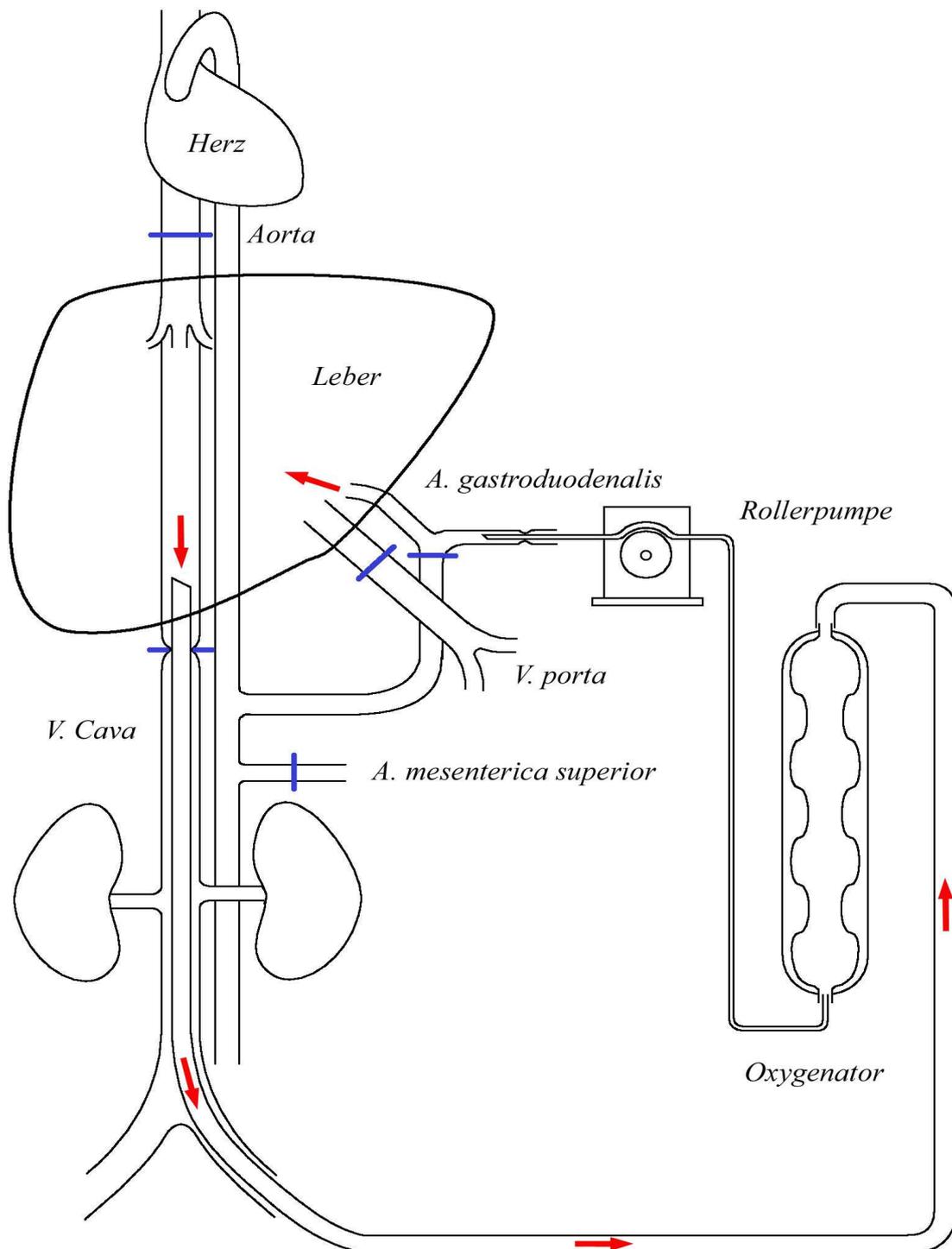


Abbildung 2: Übersicht der Isolierten Leberperfusion (IHP). Die Flussrichtung des Perfusats ist durch die roten Pfeile dargestellt. Die blauen Balken markieren die Lokalisation der Clips und der Ligatur.

5.6.2 Ablauf der hepato-arteriellen Infusion

Hier wurde eine kleine Perfusorpumpe über den Dreiwegehahn an den Katheter der Arteria gastroduodenalis angeschlossen, um die Leber über diesen zu infundieren. Die Infusion dauerte 10min. Die Tiere erhielten TNF- α (15 μ g/kg KG, 30 μ g/kg KG) gelöst in 1ml NaCl. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde lediglich 1ml NaCl appliziert. Aufgrund des geringeren apparativen Aufwandes dieses Versuches war es im Gegensatz zum IHP-Modell möglich bereits vor und während der Infusion eine Intravitalmikroskopie durchzuführen. Nach Beendigung der Stoffapplikation wurde der Katheter über den Dreiwegehahn verschlossen und die Mikroskopie weiter nach Protokoll vollzogen (Abbildung 3).

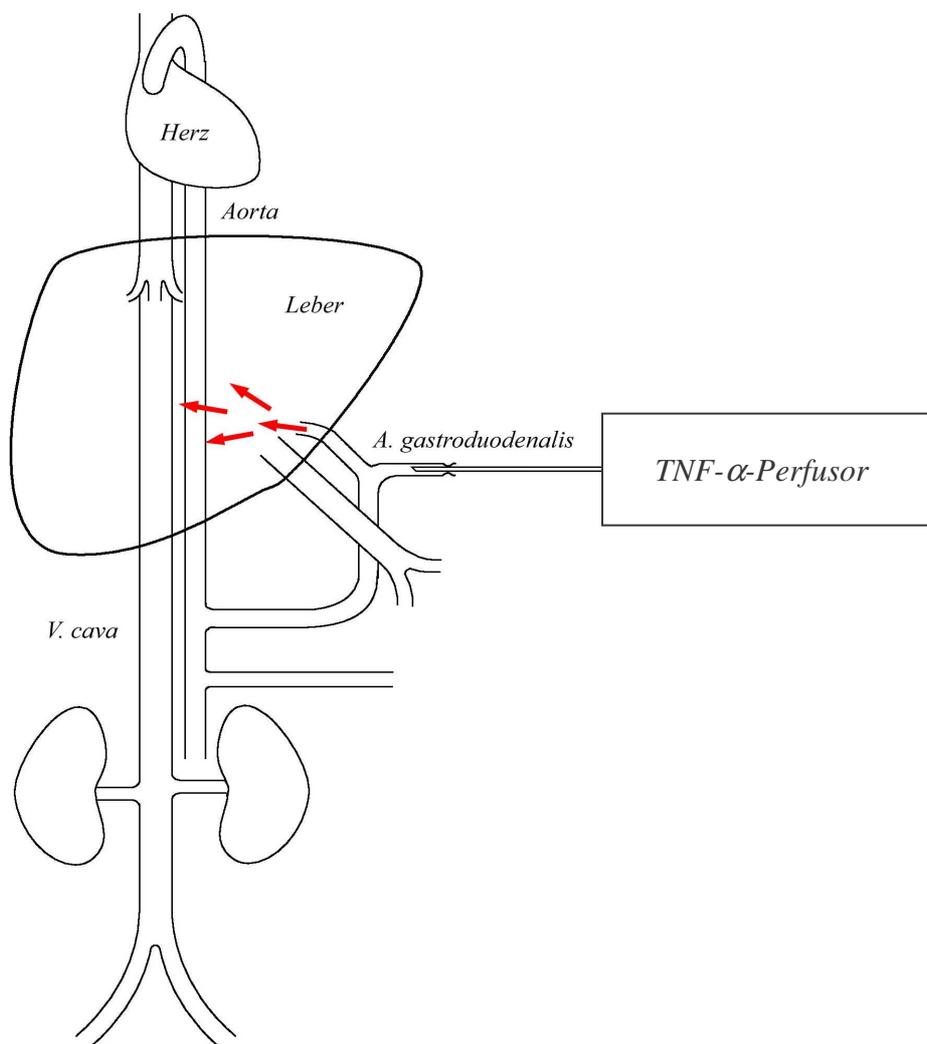


Abbildung 3: Schema der hepato-arteriellen Infusion (HAI). Der Zufluss wurde über einen Perfusor gesteuert. Die roten Pfeile deuten die Verteilung im Gewebe an.

5.7. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Nach einer etwa fünfzehnminütigen Reperfusionperiode wurde zur Vorbereitung der Intravitalmikroskopie der Operationstisch mit dem Versuchstier um 45° in der Horizontalen nach links gekippt. Der linke Leberlappen wurde unter Zuhilfenahme feuchter Wattestäbchen an seinem Gefäßstiel so in Uhrzeigerichtung rotiert, dass er schlussendlich mit der vormaligen dorsalen Seite zu oberst auf einem genau in Größe und Form der Leberoberfläche angepassten Plastilinbett in einer Metallschale ausgelagert werden konnte. Dabei wurde darauf geachtet, die Gefäße nicht zu torquieren. Die Metallschale war mit einem Magnetstativ (Mikromanipulator) verbunden, welches in drei Ebenen verstellbar war und somit gestattete, die plane Oberfläche der Dorsalseite des linken Leberlappens weitgehend unabhängig von den Atemexkursionen des Versuchstieres parallel zur Fokusebene des Mikroskops zu positionieren [Schüder et al., 1999]. Abschließend wurde der Leberlappen mit einem Deckglas (24x32mm) versehen. Durch diese Auslagerung des linken Leberlappens konnte während der intravitale Fluoreszenzmikroskopie eine Fläche von etwa 2x3cm dargestellt werden, welche morphologisch etwa 2000 Leberazini entspricht. Die Mikrozirkulation wurde dann in beiden Modellen 30min, 60min, 120min und 180min nach Perfusion analysiert. Beim HAI-Versuch war es außerdem möglich Aufnahmen vor und während der Infusion zu aquirieren.

Zu Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde Natrium-Fluoreszein (2µmol/kg Körpergewicht i.v.; MG 376; Merck, Darmstadt) zur Kontrastverstärkung und Rhodamin-6G (0,1-0,2µmol/kg Körpergewicht i.v.; MG 479; Merck, Darmstadt) zur Leukozytenanfärbung intraarteriell appliziert. Es wurden randomisiert verschiedene Gesichtsfelder in Leber- und Tumorarealen ausgewählt und für jeweils 20-30 Sekunden in jedem der beiden Filter aufgenommen. Die Gesichtsfelder wurden fokussiert und so eingestellt, dass die den Azinus bildenden Sinusoide beziehungsweise Venolen auf ihrer gesamten Länge gut einzusehen waren.

Die Intravitalmikroskopie wurde mit einem modifizierten Fluoreszenz-Mikroskop mit einer 100Watt HBO-Quecksilberdampf-Lampe (Axiotech, Zeiss, Jena, BRD), welche über ein Filtersystem zur Auflichtbeleuchtung angeschlossen war, durchgeführt [Schäfer et al., 2003]. So konnten unterschiedliche Filterblöcke entsprechend den gewählten Farbstoffen Natrium-Fluoreszein (Filterblock Nr. 15, Anregungswellenlänge: 450-490nm, Emissionswellenlänge: >515nm; Zeiss) und Rhodamin-6G (Filterblock Nr. 9, Anregungswellenlänge: 530-560 nm, Emissionswellenlänge: >580nm; Zeiss) in den Strahlengang eingebracht werden. Die mikroskopischen Bilder wurden von einer hochempfindlichen CCD (charge coupled device)-Videokamera (FK 6990; Lichtempfindlichkeit 10⁻²lux; Prospective Measurements, San Diego, California, USA) aufgenommen und über einen Bildschirm (33cm Bildschirmdiagonale; PVM-1444 QM, Sony, München) an einen Videorecorder mit einer Aufzeichnungsrate von

50 Bildern pro Sekunde (S-VHS Panasonic AG-7350, Matsushita, Tokyo, Japan) transferiert. Ein zwischen Videokamera und Bildschirm geschalteter Video-Zeitgenerator (VTG 33, FOR-A Company Ltd., Tokyo, Japan) diente der gleichzeitigen Einblendung und Aufnahme der Zeit in Minuten, Sekunden sowie Zehntel- und Hundertstel-Sekunden (Abbildung 4).

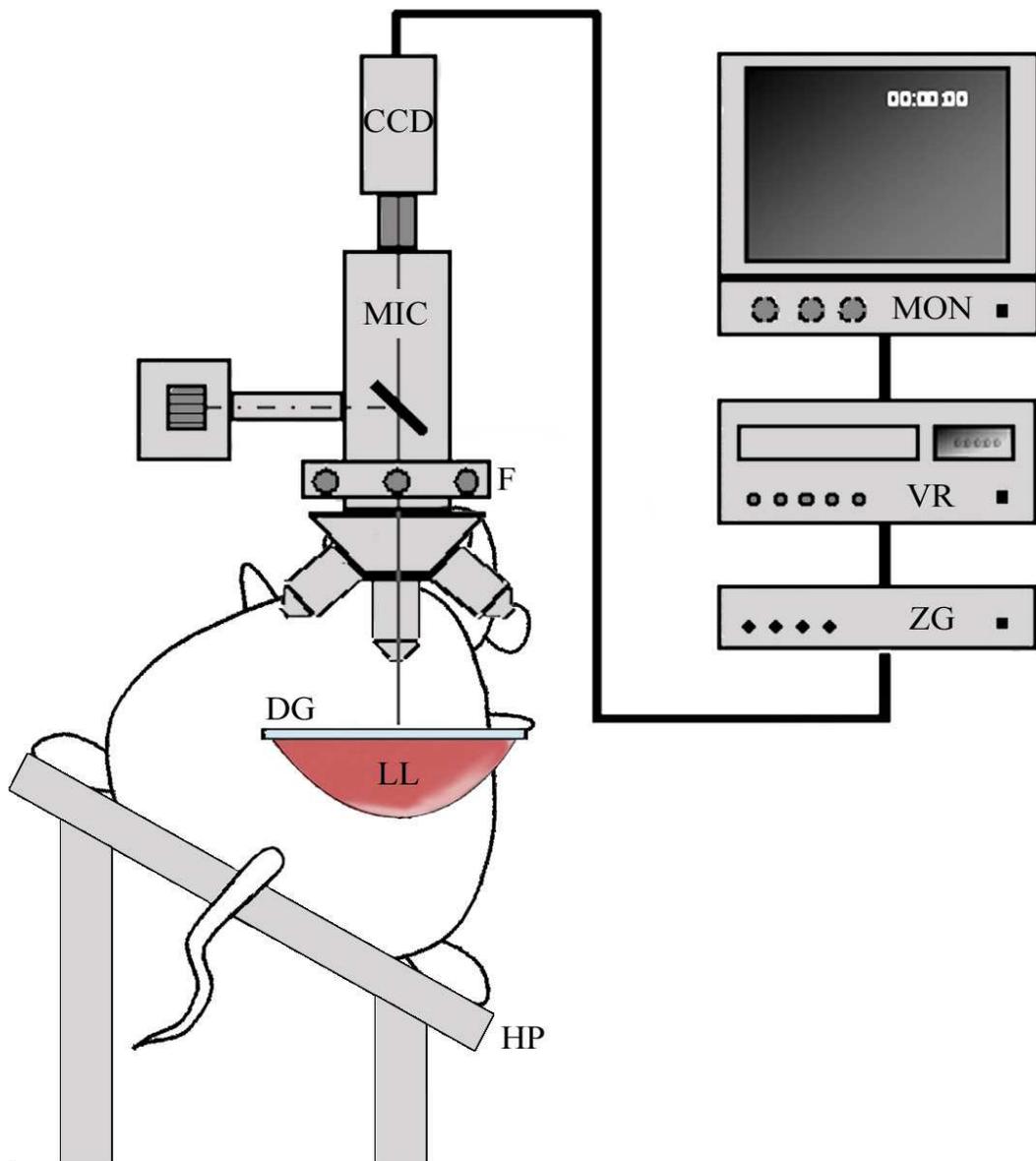


Abbildung 4: Schematische Darstellung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (IVM). Der linke Leberlappen des Versuchstieres ist so positioniert, dass die Oberfläche der Rückseite plan zum Mikroskop ausgerichtet ist. LL = linker Leberlappen, MIC = Mikroskop, CCD = CCD-Videokamera, F = Filterblöcke, DG = Deckglas, ZG = Video-Zeitgenerator; MON = Video-Monitor; VR = S-VHS-Videorecorder; HP = Tisch mit integrierter Heizplatte.

Zu Beginn der jeweiligen Versuche wurden Übersichtsaufnahmen mit einem 10x Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar 10x/0.30, Zeiss) gemacht. Für die quantitative Analyse der hepatischen Mikrozirkulation wurde ein 20x Wasser-Immersionsobjektiv (Zeiss Achroplan 20xW/0.50, Zeiss) eingesetzt. Mit den verwendeten Objektiven konnte eine bis zu 430fache Gesamtvergrößerung auf dem Bildschirm der Aufnahmeeinheit erzielt werden.

Nach Beendigung der mikroskopischen Untersuchung wurde Gewebe von Leber, Tumor und Lunge für spätere histologische Untersuchungen entnommen.

5.8. Untersuchungstechniken

5.8.1. Quantitative Bildanalyse und mikrozirkulatorische Parameter

Die Auswertung der mikrozirkulatorischen Parameter erfolgte off-line mittels Bild-zu-Bild-Analyse des angefertigten Videomaterials. Das Auswertesystem beinhaltete einen Videorekorder (S-VHS Panasonic AG-7350, Matsushita, Tokyo, Japan) und einen nachgeschalteten Monitor (33cm Bildschirmdiagonale; PVM-1444 QM, Sony, München), auf welchem über ein computergestütztes Bild-Analyse-System (CapImage; Zeintl, Heidelberg, BRD) die Bilder des Videorecorders zur Weiterbearbeitung digital visualisierbar waren. Untersucht wurden die Perfusionsbedingungen im Tumor und die im benachbarten hepatischen Gewebe. So konnten Daten zur Mikrozirkulation in den Lebersinusoiden und Lebervenenolen, sowie zu Tumorkapillaren und einzelnen größeren Tumorgefäßen erhoben werden. Die mikrozirkulatorischen Parameter waren Perfusionsausfälle, Flussgeschwindigkeit (Velocity) sowie die leukozytäre endotheliale Interaktion (Leukozytenadhärenz).

5.8.1.1. Perfusionsausfälle

Um die Perfusionsausfälle in den Sinusoiden quantifizieren zu können, wurde eine auf einer vorgefertigten Schablone befindliche Messlinie, deren Abmessungen einer Strecke von 200µm auf den Aufnahmen entsprach, quer zum Verlauf der auf dem Bildschirm des Videomonitors dargestellten Sinusoide angelegt und die nicht-perfundierten Gefäße über deren Verlauf gezählt. Als Ergebnis erhielt man Prozentangaben aus dem Verhältnis: Gesamtanzahl Sinusoide / Nicht perfundierte Sinusoide. Zur Messung des Perfusionsausfalls in den Tumorkapillaren wurde die Strecke des Gefäßbettes mit der CapImage-Software in einem Beobachtungsfeld mit standardisierter Größe nachgezeichnet und ebenfalls Prozentzahlen aus dem Verhältnis Gesamtstrecke / nicht perfundierte Strecke errechnet. Als perfundiert galten in beiden Untersuchungen die Gefäße, in welchen über den jeweiligen

Beobachtungszeitraum (20s) hinweg eindeutig Durchfluss korpuskulärer Blutbestandteile zu sehen war (Abbildung 5A, B).

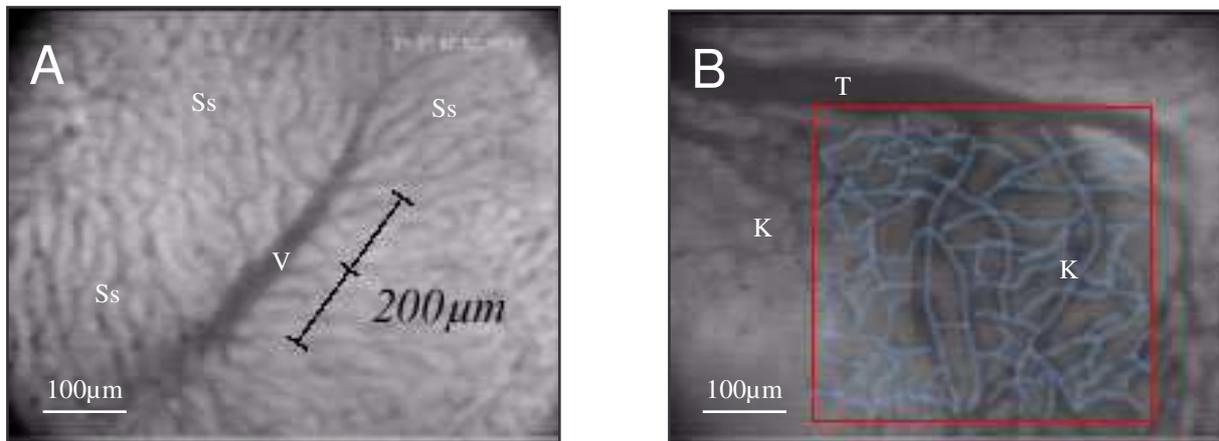


Abbildung 5A, B: Die Abbildung 5A zeigt eine typische Venole (V) mit ihren sinusoidalen Zuflüssen (Ss). Die Schablone mit einer Länge von 200µm wird parallel zur Venole und quer zum Verlauf der Sinusoide angelegt. Auf B findet sich ein Tumorgefäß (T) mit seinen Kapillaren (K). Das rote Rechteck stellt das normierte Beobachtungsfeld dar, die Tumorkapillaren sind - ähnlich der Auswertung mit dem CapImage - blau nachgezeichnet.

5.8.1.2. Endotheliale Leukozytenadhäsion

Um die Anzahl adhärenter Leukozyten in den Sinusoiden bestimmen zu können, wurde eine weitere Schablone standardisierter Größe auf der Bildschirmoberfläche angelegt, um somit ein Areal auszuwertender Sinusoide festzulegen, welche dem Ausmaß eines Azinus entsprach. Die Schablone hatte eine elliptische Struktur, da das exakte hexagonale Muster des klassischen Zentralvenenläppchens in vivo eher selten anzutreffen ist, und eine ovale Form dem durchschnittlichen architektonischen Aufbau der Azini am nächsten kommt [Rappaport et al., 1954] (Abbildung 6A). In den Tumorkapillaren wurde die Größe des Beobachtungsfeldes der Perfusionsausfälle angenommen. Als Leukozytensticker, also adhärenente Leukozyten, wurden diejenigen Zellen gewertet, welche über einen Zeitraum von 20s keine Fortbewegung in der Aufnahme zeigten (Angabe als absoluter Wert pro Azinus, beziehungsweise pro Beobachtungsfeld; Abbildung 6B).

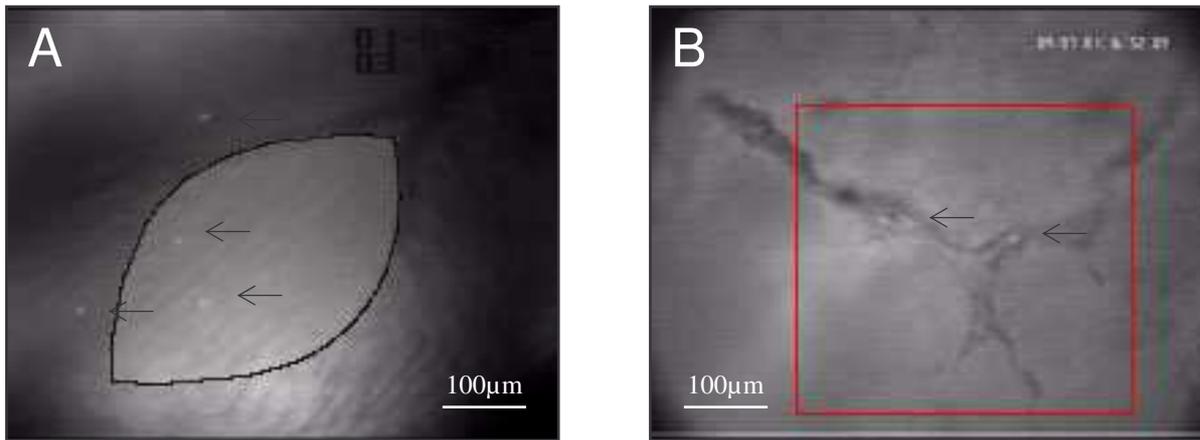


Abbildung 6A, B: In die Auswertung mit einbezogen wurden diejenigen Leukozyten, die über einen Zeitraum von 20 Sekunden adhären waren. In der normalen Leber wurde das Beobachtungsfeld unter Zuhilfenahme einer Schablone (◇) vorgegeben (Beobachtungsfeld heller im Vergleich zur Umgebung, A). Im Tumor diente das standardisierte Beobachtungsfeld als Vorgabe (B). Relevante Leukozyten sind mit einem Pfeil markiert (←).

In den Lebervenenolen und Tumorgefäßen wurden die am Endothel haftenden Leukozyten über eine Strecke von 100µm ausgezählt. Diese Strecke wurde randomisiert mit einem ebenfalls vorgefertigten Lineal ausgemessen und festgelegt. Auch hier wurden 20s Leukozytenstagnation gefordert, um als adhären zu gelten. Um die Zahl der Leukozyten pro Endotheloberfläche angeben zu können und der zylindrischen Architektur der Lebergefäße und Tumorgenoten gerecht zu werden, errechneten sich die Ergebnisse nach folgender Formel:

$$A = (\pi * D * L) / 1000000$$

Hierbei entsprach D dem Durchmesser der Gefäße (in µm), welcher mit Hilfe der CapImage-Software ermittelt werden konnte. Die Gefäßlänge L, war – durch das Lineal - auf eine Strecke von 100µm festgelegt. Als Resultat erhielt man hier eine Fläche A (in mm²). Diese wurde durch die Anzahl der ausgezählten Sticker (n) dividiert, sodass die Werte letztendlich in Leukozytensticker / mm² endothelialer Oberfläche angegeben werden konnten.

5.8.1.3. Flussgeschwindigkeit

Die Flussgeschwindigkeit in den Lebervenenolen und Tumorgefäßen wurde mit Hilfe des CapImage-Systems analysiert. Hierbei wurde auf dem Monitor ein Standbild der Videoaufnahmen erzeugt, welches ein Tumorgefäß bzw. eine Lebervenole zeigte. In das Lumen des jeweiligen Gefäßes konnte mit Hilfe des CapImage-Programms eine Gerade gelegt werden, auf deren Länge durchfließende Leukozyten beim Abspielen der Sequenz registriert wurden. Die Software ermittelte daraus Kontrastlinien, welche den

unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten entsprachen. Anhand dieser Kontrastlinien konnten Steigungen dargestellt werden, von denen mindestens 6 pro Messung mit der Computermaus manuell nachgezeichnet wurden. Somit war es möglich, dem Programm eine graphische Darstellung der Velocity vorzugeben, aus welcher selbige dann berechnet werden konnte (line shift method).

Pro Untersuchungszeitraum wurden jeweils mindestens 6 Gesichtsfelder der beschriebenen Areale (Sinusoide, Tumorkapillaren, Lebervenenolen und Tumorgefäße) analysiert und deren mikrozirkulatorische Parameter quantitativ zu erfasst.

5.8.2. Makrohämodynamik

Über den arteriellen Zugang wurde mit einem Druckaufnehmer (Statham Typ P23 ID; Gould Inc., Oxnard, California, USA) und einem analogen Meßgerät (Servomed, Hellige, Freiburg/Breisgau), welches mit einem Flachbrettschreiber (Yokogawa 3021 Pen Recorder; Yokogawa, Hersching, BRD) verbunden war, der mittlere arterielle Blutdruck (Schreibergeschwindigkeit 2mm/min) kontinuierlich gemessen. Zusätzlich erfolgte intermittierend die Ermittlung der Herzfrequenz anhand des Abstandes der Blutdruckamplituden (Schreibergeschwindigkeit 500mm/min).

5.8.3. Hämatologische Parameter und Enzymaktivitäten

Blutentnahmen aus dem Katheter der rechten Arteria carotis communis erfolgten vor der Operation, zu Beginn und am Ende der Perfusion bzw. Infusion, sowie 15min, 60min und 180min nach Perfusion bzw. Infusion.

Am Ende der Perfusion wurde bei der IHP zusätzlich noch Perfusat aus dem Lumen des Pumpsystems gewonnen. Ein Teil des Blutes wurde zum jeweiligen Zeitpunkt mit einem Kapillarröhrchen entnommen und umgehend zur Bestimmung von Hämatokrit, Hämoglobingehalt, pH, Kohlendioxidpartialdruck (P_aCO_2), Sauerstoffpartialdruck (P_aO_2), sowie Basenüberschuss (base excess, BE) mittels eines Blutgasanalysegerätes (Chiron Diagnostics 348 pH Bloodgas Analyzer; Chiron, München, BRD) verwendet.

Ferner wurden Proben für die spätere Enzymaktivitätsbestimmung aquiriert. Diese wurden, nachdem sie zunächst in einem Kühlschrank zwischengelagert waren, am Ende des Experiments in einer Kühlzentrifuge (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen) für 10min bei 4°C und 3000U/min zentrifugiert, danach abpipettiert und zur weiteren Aufbewahrung weggefroren (bei -80°C). Perfusat- und Blutproben nach Perfusion bzw. Infusion, sowie 15min und 180min danach wurden zur Quantifizierung des jeweiligen Spiegels von humanem TNF- α benötigt. Diese Untersuchungen wurden mittels ELISA (R&D Systems, Wiesbaden,

BRD) durchgeführt. Ebenso wurde die BIG-Endothelin-Konzentration aus diesen Proben bestimmt (ELISA; IBL, Hamburg, BRD). Die Probe 60min nach IHP oder HAI diente der spektrophotometrischen Bestimmung der Serumkonzentration der Leberenzyme ASAT (Aspartataminotransferase), ALAT (Alaninaminotransferase) und der LDH (Laktatdehydrogenase) als Ausdruck einer hepatozellulären Schädigung. Zudem wurden aus den Proben des letzten Entnahmezeitpunkts (nach 180 min) die Werte für den Rattenspezifischen Tumornekrosefaktor α und die Interleukine IL-6, IL-8 und IL-10 mit Hilfe der ELISA-Technik (R&D Systems) bestimmt.

5.8.4. Histomorphologie

Das nach Versuchsende entnommene Gewebe von Leber, Tumor und Lunge wurde in 4% phosphatgepuffertem Formalin für etwa drei Tage fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

5.8.4.1 Leberhistologie

Von dem vorhandenen Gewebe wurden 5 μ m Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) sowie mit AS-D Chloracetatesterase (CAE) für histologische Untersuchungen gefärbt.

Die HE-gefärbten Präparate (Abbildung 7) wurden semi-quantitativ ausgewertet. Hierbei wurde in Hepatozyten die Grobscholligkeit des Zytoplasmas, Zellkerndeformation und Vakuolisierung beurteilt. Innerhalb der Gefäße wurde die sinusoidale Kongestion bewertet. Hierfür kamen jeweils 25 High Power Fields (HPF) pro Leberschnitt zur Auswertung, in welchen die oben genannten Parameter, in Grade von 0 bis 3 eingestuft wurden [Calabrese et al., 1997]:

- Grad 0 = nein (0% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 1 = leicht (< 30% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 2 = mäßig (40%-70% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 3 = schwer (> 70% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf).

Die Ergebnisse wurden hierbei in Prozent angegeben. Weitere Beobachtungseinheiten der Gefäße waren Endothelablösung, Fibrinthrombus und Erythrozytenwandständigkeit die ebenfalls in 25 High Power Fields bewertet, und als Prozentwerte bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Gefäße angegeben wurden.

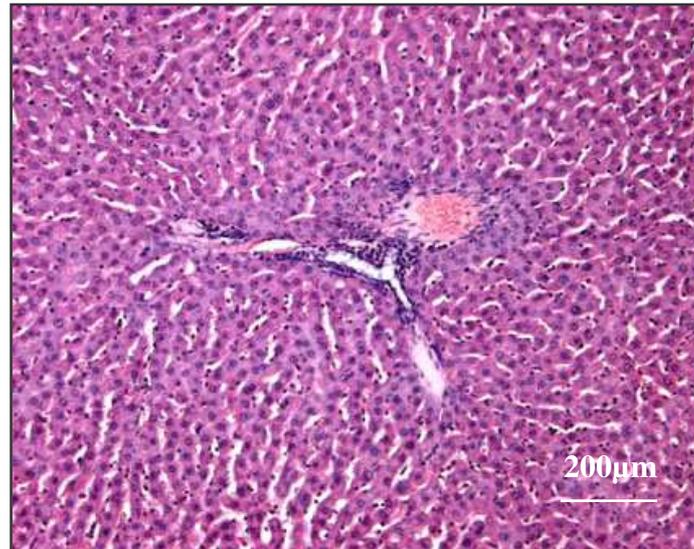


Abbildung 7: Dargestellt ist ein HE-gefärbter Schnitt der gesunden Leber eines HAI-behandelten Tieres ($15\mu\text{g TNF-}\alpha/\text{kg KG}$). Man erkennt die typische Histomorphologie der Leber. Angeschnitten ist eine y-förmige portale Venole.

Mit den CAE-gefärbten Schnitten (Abbildung 8) sollte die Leukozytenakkumulation in den Leberarealen gemessen werden. Es wurden hierfür CAE-positive Leukozyten in 48 HPF (12 HPF Sinusoide, 12 HPF Portalfeld intravasal, 12 HPF Portalfeld extravasal und 12 HPF Venolen) ausgezählt und in Absolutwerten dokumentiert.

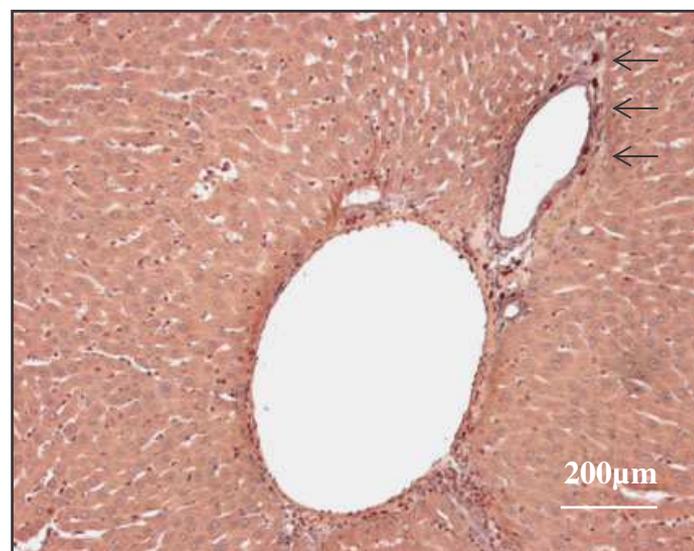


Abbildung 8: CAE-Färbung. Der Schnitt zeigt eine grosse terminale Lebervenole eines Tieres nach isolierter Leberperfusion mit $\text{TNF-}\alpha$. Man erkennt, dass die Leberstruktur keine wesentliche Veränderung zeigt. Die Leukozyten sind in der CAE-Färbung rot angefärbt (\leftarrow).

5.8.5. Immunhistochemie

5.8.5.1 Caspase-3

Zur Auswertung des Apoptosemarkers Caspase-3 wurden 5µm Schnittpräparate von in Paraffin eingebettetem Leber- und Tumorgewebe angefertigt. Diese wurden bei Raumtemperatur über Nacht mit PBS (1ml) und polyklonalen „Rabbit anti Cleaved caspase-3“ Antikörper (20µl, Verdünnung 1:50, Cell Signaling Technology, Frankfurt, BRD) inkubiert. Die anschließende Inkubation erfolgte mit „anti Rabbit“ Ig (100µl, Peroxidase-markiert, Verdünnung 1:100) als Sekundäntikörper (Link, LSAB-HRP, Dako-Cytomotion, Hamburg, BRD) für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Als Chromogen wurde 3,3`Diaminobenzidin verwendet. Schließlich wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt. Für die Datenerhebung wurden in jeweils 25 HPF pro Schnitt von Leber oder Tumor die Caspase-3 positiven Zellen ausgezählt (Abbildung 9).

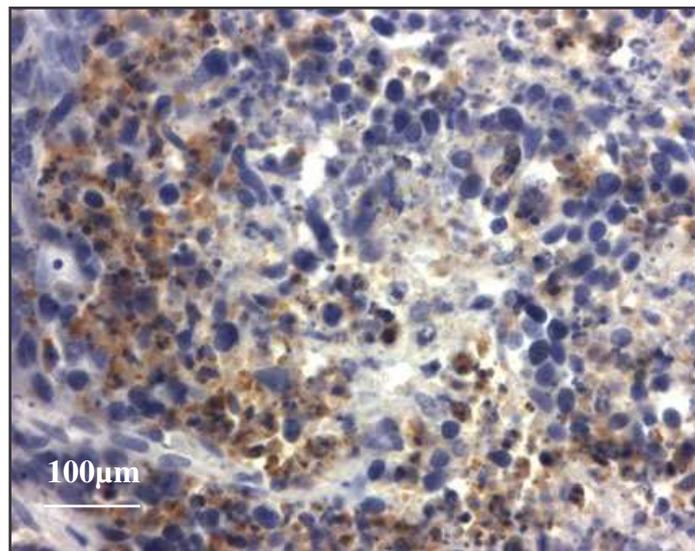


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt ein Immunhistochemie-Präparat des Apoptosemarkers Caspase-3. Dargestellt ist Tumorgewebe eines Tieres der IHP-TNF-Gruppe. Die braune Färbung indiziert Caspase-3-positive Zellen.

5.8.5.2 PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

PCNA ist ein Indikator für Zellproliferation. Erneut wurden 5µm Schnitte angefertigt und ausgewertet. Das Procedere der Färbung und Inkubation war mit der Caspase-3-Immunhistochemie vergleichbar und wird an dieser Stelle nicht mehr ausführlich beschrieben. Es wurden lediglich andere Antikörper verwendet. Der Primäntikörper war „mouse anti

PCNA“ (20µl, Verdünnung 1:50, Cell Signaling Technology). Als Sekundärantikörper diente „anti mouse“ Ig (Link, LSAB-HRP, Dako-Cytomotion).

Alle histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden an einem Lichtmikroskop (Olympus BX60, Olympus Optical, Company Ltd., Japan) mit 40x Vergrößerung (mit Ausnahme der HE-gefärbten Gefäße, welche lediglich 20 x vergrößert waren) durchgeführt. Durch eine Kamera (Zeiss Axio Cam, Zeiss, Jena, BRD) konnten die Bilder in Echtzeit auf einem Computermonitor dargestellt werden (Abbildung 10). Die Auswertung der Daten erfolgte Anhand eines Index von 0-4 (0 = <1%, 1 = 1-10%, 2 = 10-30%, 3 = 30-50%, 4 >50%; Anzahl der PCNA-positiven Zellen in %).

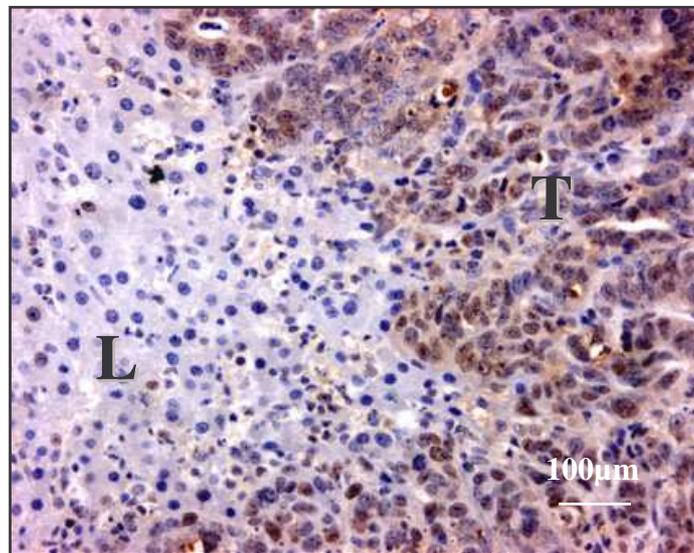


Abbildung 10: Abbildung eines PCNA-gefärbten Schnittes. Dargestellt ist der Übergang von Leber (L) - zu Tumorgewebe (T). PCNA-positive Zellen sind braun gefärbt. Erwartungsgemäß zeigt der Tumor eine wesentlich höhere Proliferationsrate im Vergleich zur Leber. Tier der HAI-TNF-Gruppe (15µg TNF- α /kg KG).

5.9. Experimentelles Protokoll

Ziel der Experimente war eine detaillierte quantitative Erfassung der Mikrozirkulation sowie zusätzlich der Makrohämodynamik, der hämatologischen Parameter und der enzymatischen Aktivität.

5.9.1 Protokoll der Perfusion (IHP)

Insgesamt durchliefen 14 Tiere das IHP-Modell. Die Tiere wurden randomisiert auf die zwei Versuchsgruppen verteilt. Wobei die TNF- α -basierte IHP bei 7 Ratten durchgeführt wurde (20 μ g TNF- α). Die restlichen Versuchstiere erhielten eine Sham-Perfusion (20ml NaCl) und dienten als Kontrollgruppe (n=7).

Bei allen Tieren dieser Versuchsgruppen erfolgte die Anästhesie und chirurgische Präparation wie unter 5.5.1. und 5.5.2. aufgeführt. Nach Präparation der A. carotis communis wurden die basalen Messungen durchgeführt. Diese beinhalteten die unter 5.8.3. angegebenen Parameter, wie arterielle Blutgase, systemischer Hämatokrit, pH- und Hb-Wert sowie den Basenüberschuss. Die weiteren Blutentnahmen erfolgten zu den weiteren erwähnten Zeitpunkten (siehe 5.8.3.). Darauf folgend wurde der linke Leberlappen gemäß 5.6.1. isoliert perfundiert. In allen Gruppen konnte dann die Analyse der Mikrozirkulation über die Intravitalmikroskopie etwa 30 Minuten nach Reperfusion durchgeführt und nach 60 Minuten, 120 Minuten und 180 Minuten wiederholt werden. Folgende mikrozirkulatorische Parameter wurden erfasst:

- 1.) Anzahl nicht-perfundierter Sinusoide und Tumorkapillaren (siehe 5.8.1.1.)
- 2.) Endotheliale Leukozytenadhäsion in Leber- und Tumorgefäßen (siehe 5.8.1.2.)
- 3.) Flussgeschwindigkeit in Leber- und Tumorgefäßen (siehe 5.8.1.3.)

Im Anschluss an die Intravitalmikroskopie erfolgte als letzter Schritt des Versuchs die Gewebeentnahme für die lichtmikroskopischen Analysen.

5.9.2 Protokoll der Infusion (HAI)

Dem Modell der HAI dienten insgesamt 21 Tiere, welche randomisiert in drei unterschiedliche Versuchsgruppen aufgeteilt waren (jeweils n=7). Die Kontrollgruppe erhielt eine Sham-Infusion (1ml NaCl) und die beiden anderen eine TNF- α -Infusion in unterschiedlicher Dosierung (15 μ g/kg KG und 30 μ g/kg KG).

Bei den Experimenten erfolgte die Anästhesie und die chirurgische Präparation gemäß 5.5.1. und 5.5.3. Die Zeitpunkte der Blutentnahmen waren äquivalent dem IHP-Modell.

Lediglich durch die einfachere Handhabung des Modells aufgrund der weniger aufwändigen Operation und dem Ausbleiben einer Reperfusionphase war es möglich zwei weitere intravitalmikroskopische Untersuchungen durchzuführen. So konnten zusätzlich Baseline-Aufnahmen vor der Infusion, sowie Aufnahmen während der Infusion generiert werden. Die HAI wurde dem Punkt 5.6.2. entsprechend absolviert. Die zu bewertenden Parameter waren in beiden Modellen identisch. Ebenso wurde am Versuchsende Gewebe für die histomorphologischen Untersuchungen entnommen.

5.10. Datenerfassung und Statistik

Alle ausgewerteten Parameter wurden zunächst handschriftlich festgehalten und anschließend an einem Computer in Excel-Tabellen übertragen und zusammengefasst (Microsoft®Excel 2000, Microsoft Cooperation, USA).

Aus den so dokumentierten Datensätzen wurden die Mittelwerte (MW), sowie Standardabweichung (SD) und die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM, Standard error of the mean) erhoben. Nach Untersuchung von Varianzgleichheit und Normalverteilung der Werte wurden die Unterschiede in den einzelnen Gruppen mittels ANOVA (one-way analysis of variance) durchgeführt. Darauf folgte ein geeigneter post-hoc Test, welcher die Korrektur des alpha-Fehlers gemäß Bonferroni beinhaltet, um Mehrfachvergleiche zu kompensieren. Der Vergleich zwischen den Versuchsgruppen erfolgte durch den Student's t-Test für unverbundene Stichproben. Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant betrachtet. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung wurden die Programme SigmaStat und SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) verwendet.

6. ERGEBNISSE

6.1. Isolierte hepatische Perfusion

6.1.1. Tumorwachstum

Die Methode der Tumorimplantation mittels subkapsulärer Injektion der malignen Zellen konnte bei allen dafür vorgesehenen Versuchstieren problemlos durchgeführt werden. Die dabei angewandte Äthernarkose wurde gut vertragen. Nach Einbringung des Zellmaterials und anschließender Hautnaht durchliefen die Tiere eine kurze Aufwachphase, bei welcher keinerlei Beeinträchtigung der Atemfunktion zu bemerken war. In der 11tägigen Wachstumszeit des Tumors fielen keine Änderungen im Fressverhalten oder sonstige Verhaltensabweichungen auf. Die Wundheilung erfolgte jeweils per primam. Das Körpergewicht blieb bis zur Relaparatomie weitestgehend konstant oder nahm gering zu. Es ließen sich keine systemischen Effekte durch das Tumorwachstum beobachten. Nach Ablauf der Wachstumsphase zeigten die Tiere einen kugelförmigen Lebertumor von etwa 5mm Durchmesser. Bei zwei Tieren entstanden durch Streuung der Tumorzellen lediglich multiple Tumornester anstelle der Ausbildung eines unifokalen größeren Tumors. Keines der Versuchstiere zeigte Zeichen einer extrahepatischen oder intraperitonealen Tumorzellaussaat.

6.1.2. Modell der IHP

Die isolierte hepatische Perfusion konnte bei allen dafür vorgesehenen Tieren erfolgreich durchgeführt werden. Die adäquate Isolierung der Perfusion vom restlichen Gefäßsystem wurde anhand des Flüssigkeitsspiegels im Reservoir des Oxygenators geprüft. Dieser blieb während des Versuchablaufs bei allen Experimenten konstant. Des weiteren wurde die Farbänderung des von der Leber zum Pumpsystem zurückfließenden Perfusats registriert. Kurz nach Beginn der Perfusion imponierte dieses hell und relativ farblos, da ein Großteil der roten Blutkörperchen zu diesem Zeitpunkt bereits ausgeschwemmt war.

In allen Versuchsgruppen waren mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz der Tiere zu Beginn der Experimente im Normbereich (TNF $101,7 \pm 1,7$ vs. Kontrolle $97,0 \pm 5,8$ mmHg). Während der IHP fiel der systemische Blutdruck ab und konnte auch nach Ablauf des Versuchs und der anschließenden dreistündigen Nachuntersuchungsperiode nicht mehr auf seine Ausgangswerte zurückkehren. Der Abfall des Blutdrucks war in allen Gruppen vergleichbar (Abbildung 11A). Der Basenüberschuss zeigte ebenfalls einen deutlichen Abfall über die Zeit (Abbildung 11B). Der pH hingegen war in beiden Gruppen konstant (Daten

nicht abgebildet). Ein Tier der Tumorkontrollgruppe verstarb 140min nach der IHP an den hämodynamischen Konsequenzen. Alle anderen Tiere überlebten die Nachuntersuchungszeit.

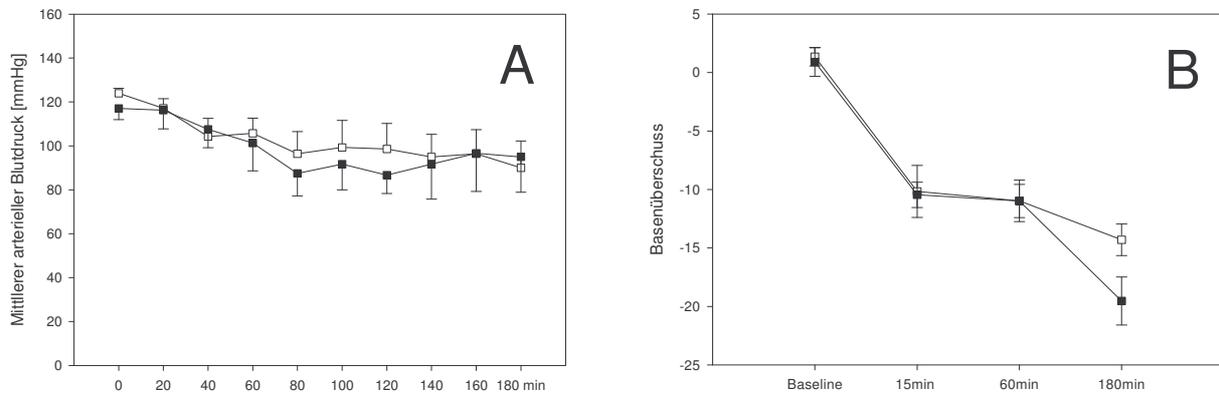


Abbildung 11 A, B: Mittlerer arterieller Blutdruck (A) und Basenüberschuss (B). Der Zeitpunkt 0 in Abb A entspricht der Baseline in Abbildung B. Weitere Messzeitpunkte über die folgenden 180 Minuten der Perfusion. NaCl-Perfusion der Kontrollgruppe (□) vs. TNF-Perfusion (■). Mittelwert \pm SEM.

6.1.3. Intravitalmikroskopie

6.1.3.1. Perfusion der Sinusoide und Tumorkapillaren

Bei der Untersuchung der Perfusion wurden die Lebersinusoide respektive Tumorkapillaren intravitalmikroskopisch untersucht (Abb. 12A, B).

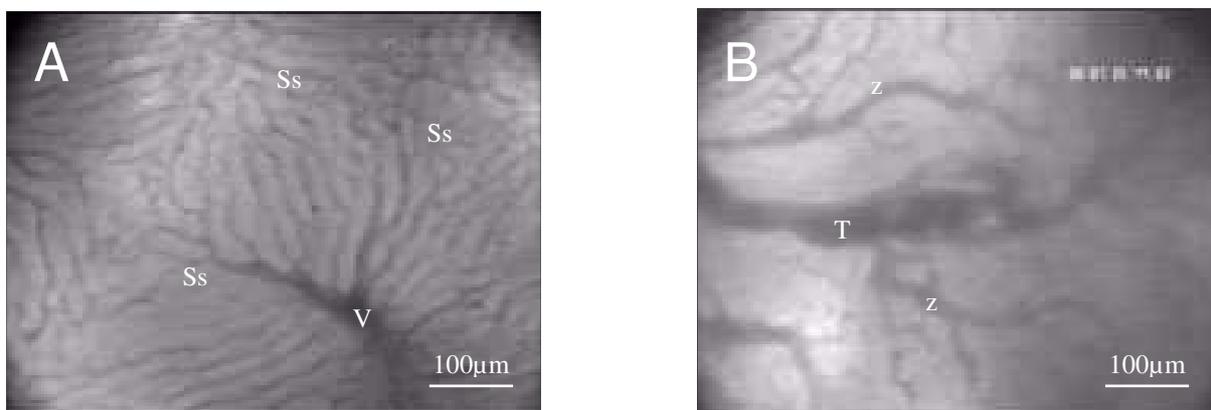


Abbildung 12 A, B: Abbildung A zeigt eine normale Lebervene (V) mit Zufluss aus den Sinusoiden (Ss). Abbildung B zeigt ein Tumorgefäß (T) mit seinen irregulären Zuflüssen (z) aus der Tumorpheripherie.

Es zeigte sich in beiden Geweben eine Beeinträchtigung der Perfusion unter TNF- α , welche jedoch im Tumorgewebe deutlich ausgeprägter war. In der Leber fand sich insgesamt ein nur geringer Unterschied zwischen den beiden Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum. Dagegen zeigten sich in den Tumorkapillaren zu jedem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede. Schon nach 30 Minuten waren $67.1 \pm 5.3\%$ ($p < 0,05$) der Kapillaren nicht mehr perfundiert. Zum Ende des Untersuchungszeitraumes waren es gar $91.2 \pm 3.8\%$ ($p < 0,05$). Interessanterweise zeigte sich also nach Perfusion mit Tumornekrosefaktor alpha ein selektiver Perfusionsausfall im Tumorgewebe. Das normale Lebergewebe hingegen blieb auch bei TNF-Perfusion nahezu unbeeinträchtigt, was sich in einem minimalen Perfusionsausfall von nur $5 \pm 2\%$ bzw. $4 \pm 2\%$ ($p < 0,05$) zu Beginn der Versuche widerspiegelte. Auch in der Folge nahm der Perfusionsausfall geringfügig zu (Abb. 13A, 13B).

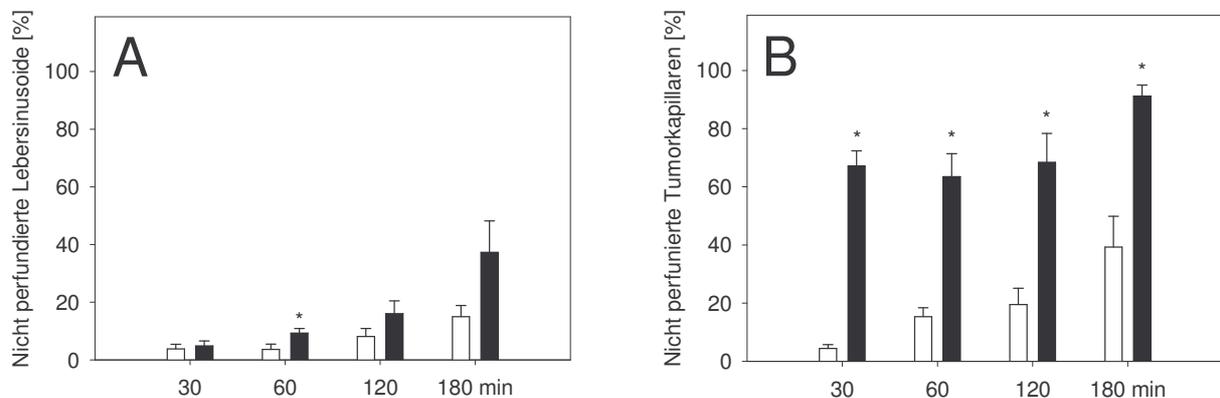


Abbildung 13A, B: Nicht perfundierte Lebersinusoiden (A) vs. nicht perfundierte Tumorkapillaren (B). Bestimmung 30, 60, 120 und 180 Minuten nach Perfusion mit NaCl (□) bzw. TNF- α (■). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl.

6.1.3.2. Flussgeschwindigkeit in Lebervenenolen und Tumorgefäßen

Neben dem Perfusionsausfall wurde als sekundärer Perfusionsparameter die Flussgeschwindigkeit für einen Perfusionsrückgang in den einzelnen blutführenden Gefäßen gemessen. Konsekutiv zur Beeinträchtigung der Gesamtperfusion konnte, ebenfalls eine deutliche Reduktion der Flussgeschwindigkeit festgestellt werden. Abermals zeigte sich, dass der TNF-Effekt im Tumorgewebe verglichen zum benachbarten Lebergewebe ausgeprägter war. Zwei Stunden nach Perfusion mit TNF- α war in den Lebervenenolen noch eine Flussgeschwindigkeit von $65,2 \pm 9,3 \text{ mm/s}$ zu messen, im Tumor hingegen nur noch $30,1 \pm 8,1 \text{ mm/s}$ ($p < 0,05$; Abb. 14 A, 14B). Äquivalent zum Perfusionsausfall fand sich also eine ausgeprägte Verminderung der Flussgeschwindigkeit im Gefäßbett des Tumors.

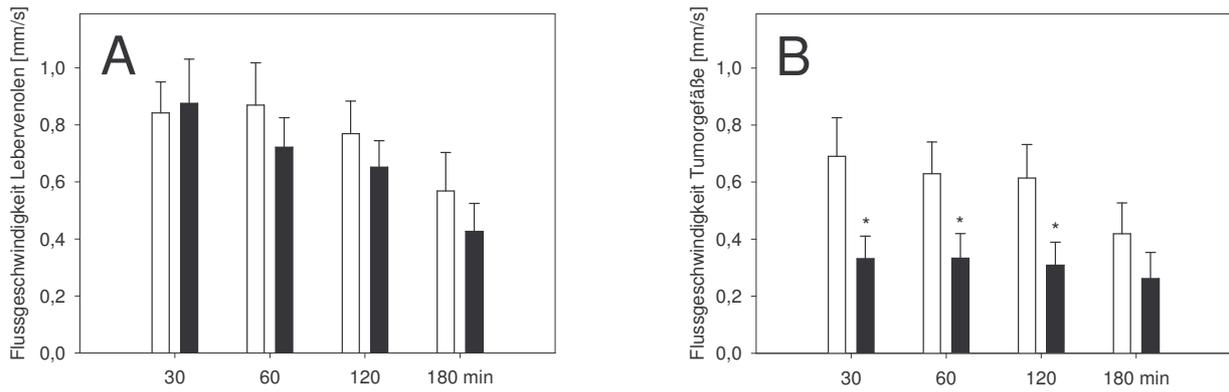


Abbildung 14A, 14B: Die Abbildungen zeigen die Flussgeschwindigkeit in den Lebervenolen (A) und den Tumorkapillaren (B). Angaben in mm/s. Gemessen wurde zu den Zeitpunkten 30, 60, 120 und 180 Minuten nach Perfusion. NaCl- (□) vs. TNF-α (■). Mittelwert ± SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl.

6.1.3.3. Leukozytenadhärenz

Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion spiegelte die Ausprägung der leukozytären Immunreaktion der Versuchstiere wider. Die adhärenenten Leukozyten wurden in Leberazini und Tumorkapillaren als Anzahl pro Beobachtungsfeld, in Lebervenolen und Tumorvenolen als Anzahl pro Endotheloberfläche bestimmt (Abb. 15 A-D).

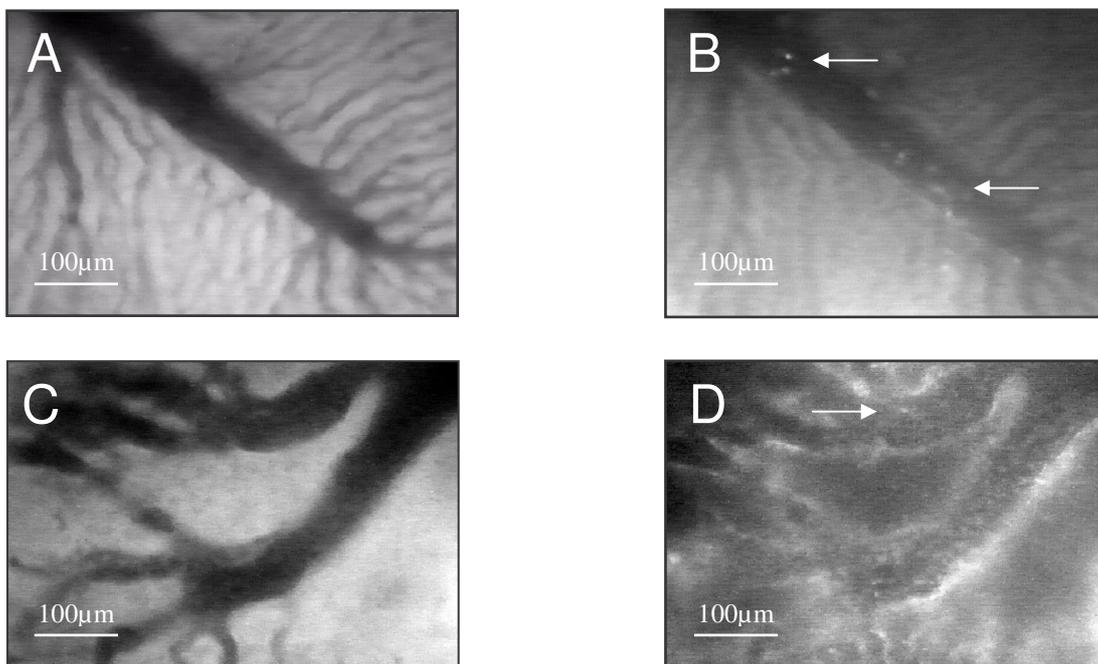


Abbildung 15A-D: Mikrovaskularisation der Leber und des Tumors. A zeigt eine Venole und die dazugehörigen Sinusoide im Natrium-Fluorescein-Filter, B das identische Gefäß im Rhodamin G6-Filter zur Darstellung der Leukozyten (siehe Pfeile). Gleiches gilt für die Bilder C und D die konfluierende Tumorvenolen zeigen.

Abbildungen 16A und 16B zeigen die an der Endothelwand haftenden Leukozyten im Kapillarbett von normaler Leber und Tumorgewebe. Insgesamt war die leukozytäre Reaktion in der Leber nur sehr gering ausgeprägt, im Tumor hingegen sehr deutlich. Die Leukozytenadhärenz blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum relativ konstant, zeigte aber interessanterweise kaum signifikante Unterschiede bei dem Vergleich zwischen NaCl- und TNF-Perfusion. Nach 180 Minuten fanden sich im Lebergewebe $11,1 \pm 1,7$ pro Azinus wenn eine Sham-Perfusion durchgeführt wurde und $13,7 \pm 1,3$ Leukozyten pro Azinus unter TNF-Gabe. Im Tumor waren es zum selben Zeitpunkt $35,1 \pm 4$ bzw. $38,4 \pm 5,1$ pro Beobachtungsfeld ($p < 0,05$).

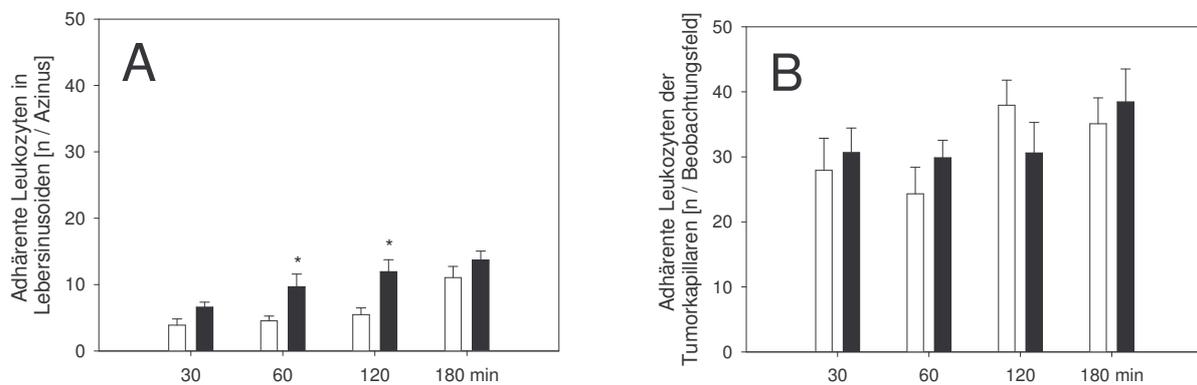


Abbildung 16A, 16B: Adhärenz Leukozyten in Lebersinusoiden und Tumorkapillaren. Angaben pro Azinus bzw. Beobachtungsfläche. Messzeitpunkte 30, 60, 120 und 180 Minuten post Perfusion. NaCl- (□) vs. TNF- α (■). Mittelwert \pm SEM.

Bei Analyse der adhärenen Leukozyten in Leber- und Tumorvenolen fanden sich nur teilweise signifikante Unterschiede zwischen den Tieren der TNF-Gruppe und der Kontrollgruppe. Unter der Wirkung des Tumornekrosefaktors war jedoch durchweg eine höhere Anzahl adhärenen Leukozyten zu verzeichnen. Eine ausgeprägte Differenz zwischen der gesunden Leber und dem pathologisch veränderten Gewebe war nicht festzustellen. Die Abbildungen 17A und 17B veranschaulichen die Ergebnisse. Die Angaben beziehen sich auf die Zellzahl pro mm^2 Endotheloberfläche der Gefäße.

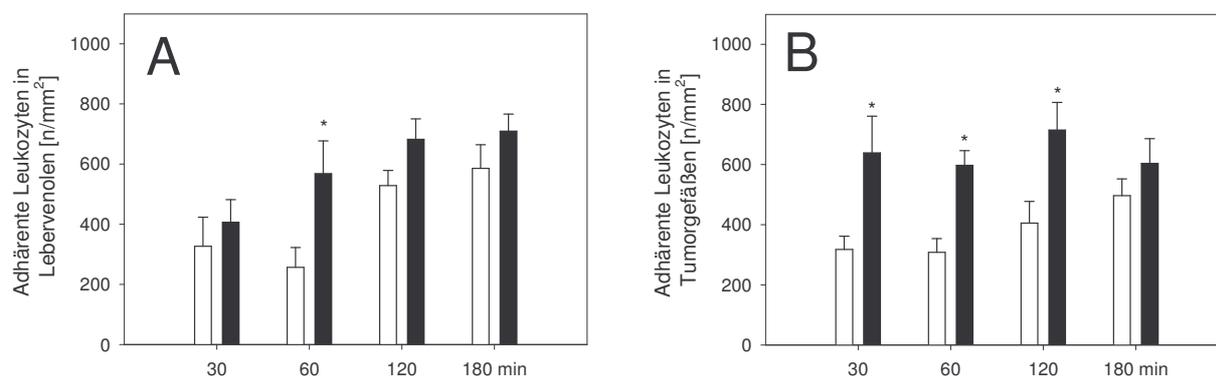


Abbildung 17A, 17B: Anzahl der adhärenen Leukozyten (angegeben pro mm² Endotheloberfläche) in normalen Lebervenolen (A) und Tumorgenolen (B). Die Leukozytenadhäsion wurde 30min, 60min, 120min, und 180min nach NaCl- (□) bzw. TNF- α -basierter (■) Leberperfusion gemessen. Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. NaCl.

6.1.4. Histologie

6.1.4.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)

Histomorphologische Veränderungen wurden an HE-gefärbten Schnitten untersucht. Untersuchungsparameter waren hier Grobscholligkeit und Vakuolisierung des hepatozellulären Plasmas, sowie Deformation des Zellkerns und die erythrozytäre Kongestion in der sinusoidalen Strombahn. Es fanden sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen (siehe Tabelle 1).

	TNF- α	NaCl	
Grobscholligkeit	14.3 \pm 7.8%	16.0 \pm 6.0%	N.S.
Vakuolisierung	1.1 \pm 1.1%	2.0 \pm 1.4%	N.S.
Zellkerndeformation	0.0 \pm 0.0%	2.3 \pm 1.2%	N.S.
Sinusoidale Kongestion	5.1 \pm 2.4%	0.0 \pm 0.0%	N.S.

Tabelle 1: Analyse der relativen Häufigkeit von morphologischen Veränderungen in Zytoplasma und Zellkern der Hepatozyten nach isolierter Leberperfusion. Mittelwert \pm SEM.

Demnach hat die isolierte Leberperfusion, unabhängig davon ob sie mit TNF oder lediglich mit Kochsalz durchgeführt wurde, keinen nennenswerten akuten Effekt auf die Morphologie der Hepatozyten.

Des Weiteren wurden Veränderungen in der Gefäßstruktur analysiert. Parameter auf vaskulärer Ebene waren Läsionen am Endothel der Lebervenenolen und das Vorhandensein von intravaskulären Fibrinablagerungen. Außerdem wurde die Wandadhärenz der intraluminalen Erythrozyten als zusätzlicher Hinweis auf ein inflammatorisches Geschehen beurteilt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sowie Bildbeispiele zeigen die Abbildungen 18 und 19A, B.

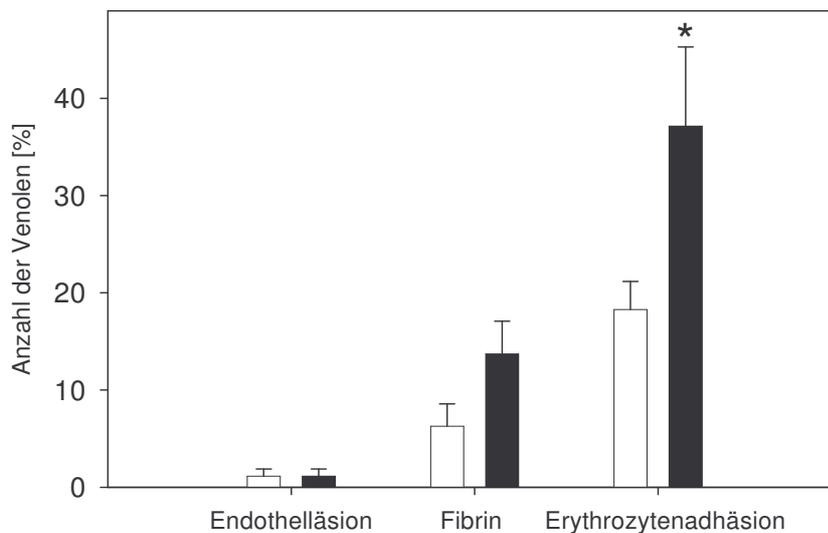


Abbildung 18: Endothelablösung, intravaskuläre Fibrinablagerungen und Erythrozytenadhärenz in Lebervenenolen nach IHP. Angaben in Prozent der analysierten Venolen. Sham-Perfusion mit NaCl (□) vs. TNF- α -Perfusion (■). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs. NaCl.

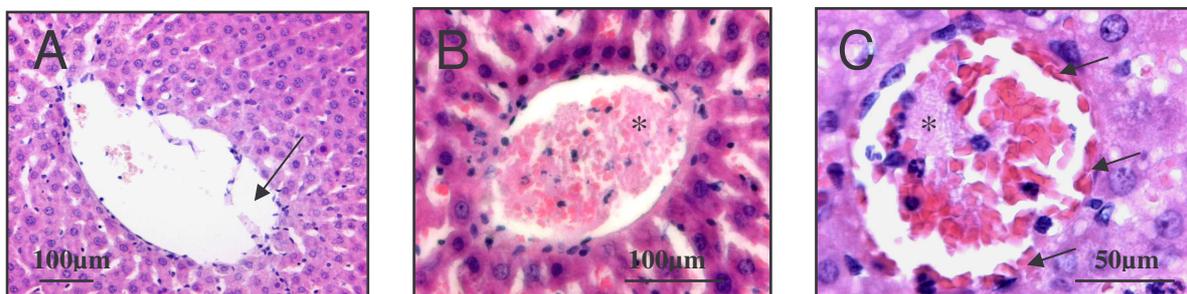


Abbildung 19A-C: A zeigt eine Endothelablösung in einer Lebervenole (Pfeil). B und C zeigen Fibrinablagerungen im Lumen (*). Zusätzlich finden sich in C randständige Erythrozyten (Pfeile) sowie eine mäßiggradig ausgeprägte Grobscholligkeit der Hepatozyten.

Insgesamt fanden sich kaum Endothelläsionen. Fibrinablagerungen waren in den Venolen der TNF-perfundierten Versuchstiere mit etwa 14% häufiger zu finden im Vergleich zu den Sham-perfundierten Tieren, bei denen man nur in 6-7% aller Fälle solche Fibrinclots detektieren konnte. Die Erythrozytenadhärenz war signifikant häufiger nach Perfusion mit Tumornekrosefaktor zu beobachten.

6.1.4.2. AS-D Chloracetatesterase (CAE)

In den CAE-gefärbten Schnitten wurde die Leukozyteninfiltration in die Lebergefäße quantitativ analysiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Jedoch war die Leukozytenanzahl in der TNF-Gruppe durchweg höher. Bei Vergleich der quantitativen Verteilung auf die Sinusoide, Portalfelder und Venolen waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen diesen zu beobachten (Abbildung 20).

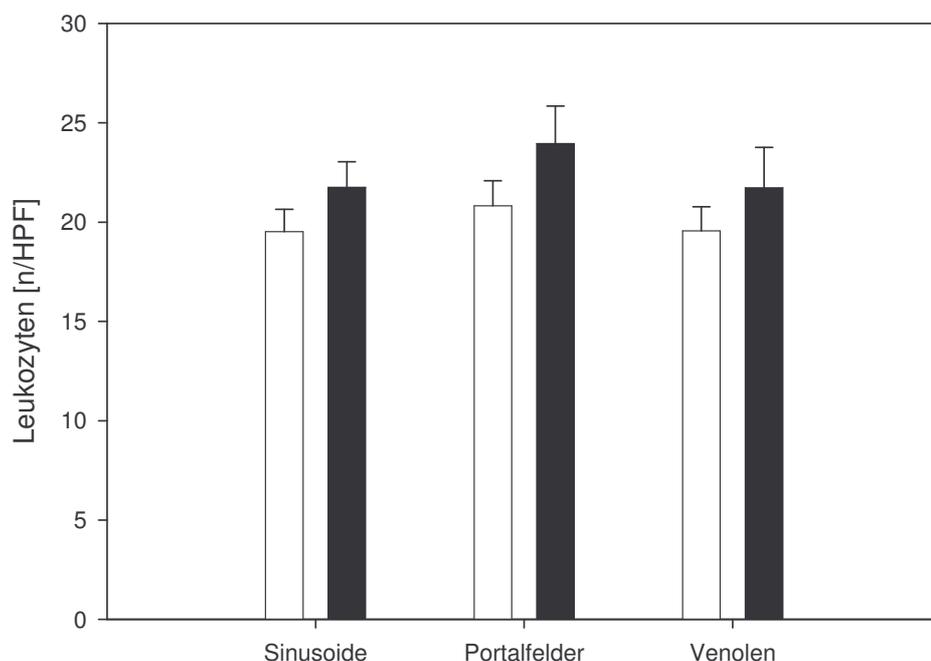


Abbildung 20: Leukozytäre Infiltration im Bereich von Sinusoiden, Portalfeldern und Venolen im tumorfreien Lebergewebe 180 Minuten nach Perfusion. NaCl (□) vs. TNF- α (■). Mittelwert \pm SEM.

6.1.5. Immunhistochemie

6.1.5.1. Apoptoseindex, Caspase-3

Der Nachweis apoptotischer Zellen gelang mit Hilfe der Inkubation der histologischen Schnitte mit Caspase-3-Antikörpern. Die quantitative Analyse der Caspase-3-positiven Zellen ergab einen deutlich höheren Apoptoseindex im Tumorgewebe. Es wurden 25 High-Power-Fields pro Tier und Schnitt analysiert. Die Tumorzellen der Versuchstiere, welche die TNF-Perfusion durchliefen zeigten signifikant erhöhte Apoptoseraten. Im Vergleich dazu fanden sich in tumorfreien Leberanteilen kaum apoptotische Zellen. Letztlich war der Apoptoseinduzierte Effekt des Tumornekrosefaktors selektiv nur in den malignen Zellen zu beobachten. Die Abbildungen 21A-C zeigen zum einen Schnitte des Tumorgewebes und zum anderen die graphische Darstellung der Ergebnisse (Abbildung 21A-C).

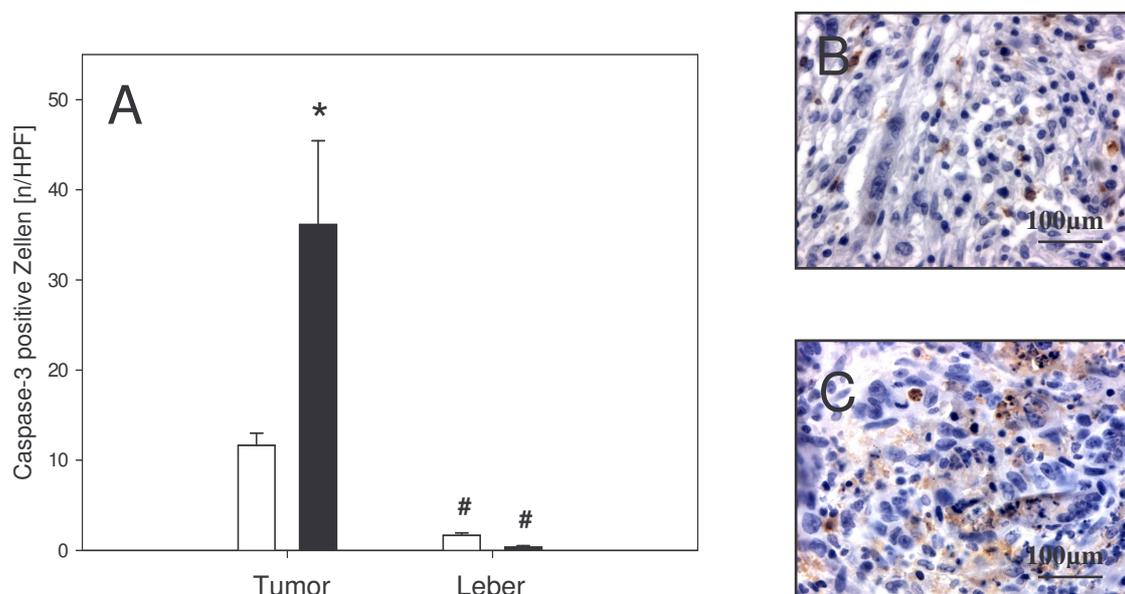


Abbildung 21A-C: Analyse der Caspase-3-positiven Zellen als Apoptose-Marker. B zeigt Tumorgewebe der Kontrollgruppe und C Tumorgewebe 180 Minuten nach TNF- α -basierter IHP. Man sieht den höheren Anteil apoptotischer Zellen in C. A zeigt die quantitative Analyse (jeweils 40x Objektiv). Die Angaben sind Anzahl apoptotischer Zellen pro HPF. NaCl (□) vs. TNF- α (■). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ versus NaCl, # $p < 0.05$ versus Tumor.

6.1.5.2. Proliferationsindex, PCNA

Der Proliferationsmarker PCNA diente der Veranschaulichung von in Proliferation befindlichen Zellen (Abbildung 22A-C). Wie zu erwarten waren im Tumorgewebe, welches per se einen hohen Proliferationsindex aufweist, erhöhte Werte zu verzeichnen. Die tumorfreie Leber wies nur geringe Proliferationsraten auf. Dementsprechend fand sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Tumor- und der Leberanalyse ($p < 0.05$). Zwischen den beiden Versuchsgruppen (TNF vs. NaCl) konnte jedoch kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden.

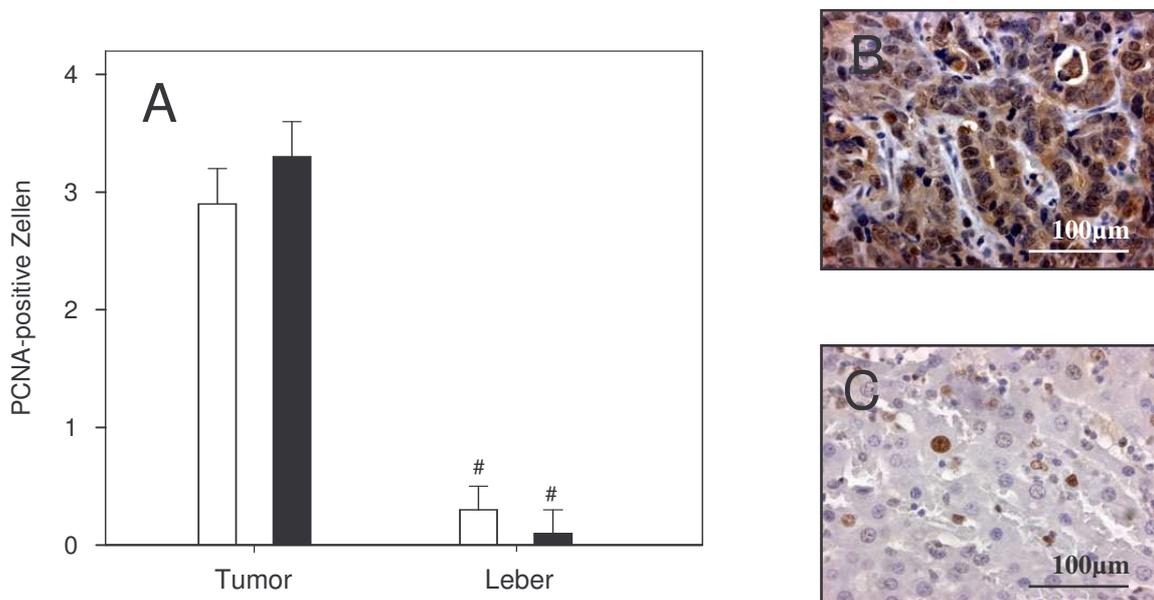


Abbildung 22A-C: A zeigt die quantitative Analyse der PCNA-positiven Zellen in Leber und Tumor. Die Daten sind als Index wiedergegeben (Index: 0 = <1%, 1 = 1-10%, 2 = 10-30%, 3 = 30-50%, 4 >50%). NaCl-perfundierte Tiere (□) vs Tiere der TNF- α -Gruppe (■). Mittelwert \pm SEM; # $p < 0.05$ versus Tumor. B zeigt den Tumor eines TNF- α -perfundierte Tieres. Die braun gefärbten Areale zeigen PCNA-positiv Zellen. C zeigt den Randbereich des Tumors mit der angrenzenden Leber (jeweils 40x Objektiv). Man kann vereinzelt PCNA-positiv Zellen abgrenzen.

6.1.6. Laborchemische Parameter

6.1.6.1 Leberenzyme

Die Bestimmung der leberspezifischen Enzyme Aspartataminotransferase (ASAT) und Alaninaminotransferase (ALAT) sowie der Laktatdehydrogenase (LDH) sollten Aufschluss über den hepatozellulären Schaden durch die Prozedur der isolierten Leberperfusion erbringen. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der Leberschaden, wiedergespiegelt durch die Enzymveränderungen, keine deutliche Ausprägung zeigte. Der hepatische Schaden gemessen als hepatozelluläre Enzymfreisetzung war für alle drei Enzyme (ASAT, ALAT, LDH) in der Gruppe der TNF-behandelten Tiere höher, wobei die Werte der LDH statistische Signifikanz erreichten ($p < 0,05$, siehe Abbildung 23).

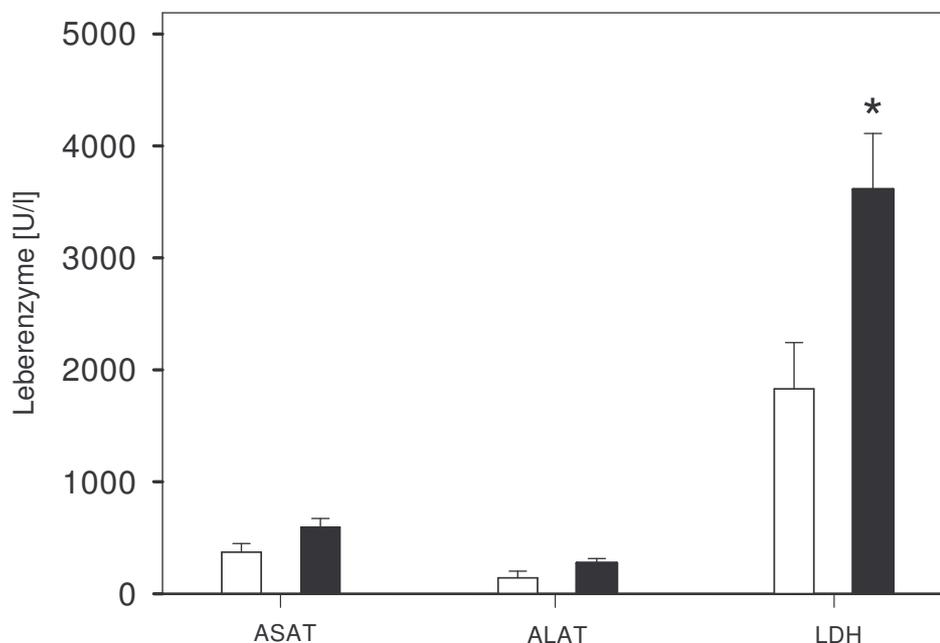


Abbildung 23: ASAT, ALAT und LDH als Ausmaß der Leberschädigung nach isolierter hepatischer Perfusion. NaCl (□) vs TNF- α (■). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ versus NaCl.

6.1.6.2 Zytokine

Zur Analyse der Zytokinantwort auf die isolierte Perfusion wurden die Serumkonzentrationen der proinflammatorischen Interleukine -6 und -8, sowie des antiinflammatorischen Interleukin-10 gemessen. Außerdem wurde der Ratten-spezifische TNF- α im Serum bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 24A–D dargestellt. Die TNF-Perfusion bewirkte einen Anstieg des IL-6 im Vergleich zur NaCl-Kontrolle. Zeitgleich fand

sich IL-10 signifikant erniedrigt. Auf den Serumspiegel des IL-8 hatte die IHP in keiner der beiden untersuchten Populationen eine relevante Auswirkung. Die TNF-Konzentrationen zeigten ebenfalls geringfügige Schwankungen. Die tiereigene TNF-Produktion wurde durch das perfundierte TNF nicht verändert. Es fanden sich weder deutliche Hinweise auf eine Stimulation der Zytokinausschüttung noch auf eine Verminderung im Sinne einer negativen Rückkopplung. Insgesamt waren hohe proinflammatorische und niedrige antiinflammatorische Interleukinspiegel bei den TNF-Tieren zu beobachten. In der NaCl-Gruppe fand sich dagegen eine insgesamt antiinflammatorische Zytokinantwort.

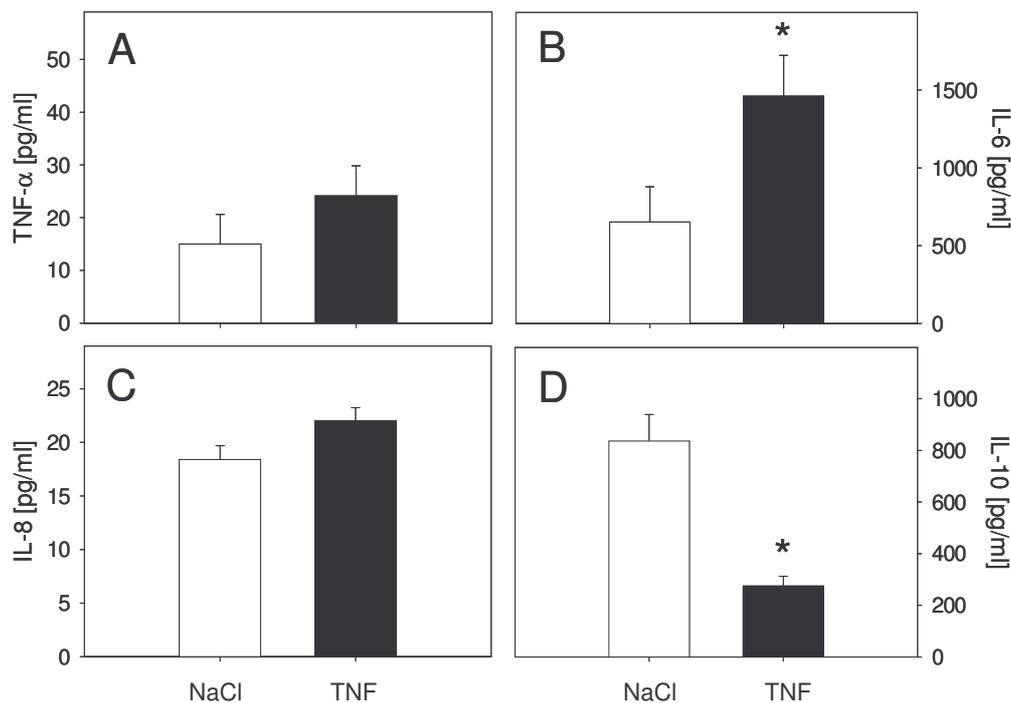


Abbildung 24A-D: Serum-Zytokinspiegel 180 Minuten nach Perfusion (A = TNF- α , B = IL-6, C = IL-8, D = IL-10). Alle Daten sind in pg/ml wiedergegeben. NaCl (\square) vs TNF- α (\blacksquare). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ versus NaCl.

6.1.6.2 Transhepatische TNF-alpha-Passage

Um die Qualität der Isolierung der Perfusion überprüfen zu können, wurde der Übertritt des applizierten TNF- α in den Blutkreislauf der Versuchstiere im Sinne einer Leckage-Kontrolle gemessen. Zu Beginn und am Ende des Versuches, also 15 und 180 Minuten nach Perfusion, wurden aus dem Perfusat und dem Blutserum die Konzentrationen des rekombinanten humanen TNF- α (rh TNF- α) bestimmt. Hierbei ergab sich nach Perfusion ein Wert von 691 ± 46 ng/ml für das Perfusat und für den Systemkreislauf ein Wert von $19,9 \pm 6,0$ ng/ml, was einem Shuntvolumen von etwa 2,9% des Gesamtvolumens entspricht.

Nach 180 Minuten betrug der Serumspiegel lediglich $1,7 \pm 0,7$ ng/ml und somit 0,25% des Ausgangswertes des Perfusates (Abbildung 25). Letztlich war also ein Shunt zwischen extrakorporalem und systemischen Kreislauf vorhanden, insgesamt war dieser aber nur sehr gering ausgeprägt.

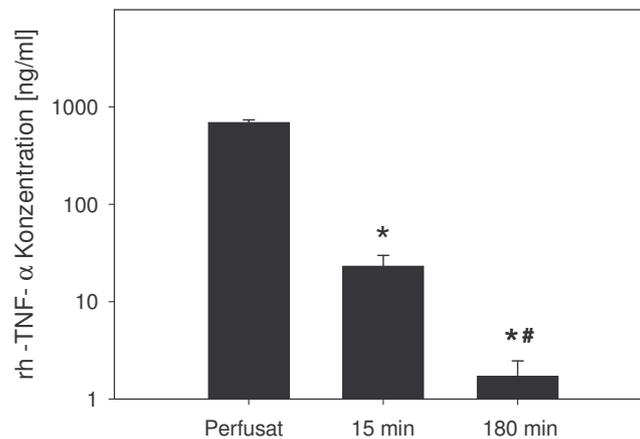


Abbildung 25: Konzentration des rh-TNF- α im Perfusat und im Serum 15 und 180 Minuten nach Perfusion. Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ versus rh-TNF- α Konzentration im Perfusat; # $p < 0.05$ versus rh-TNF- α Konzentration nach 15 Minuten.

6.2. Hepato-arterielle Infusion

6.2.1. Tumorwachstum

Die Tumorimplantation erfolgte jeweils problemlos und die dafür notwendige Äthernarkose wurde von allen Tieren der drei Versuchsgruppen (TNF 30 μ g/kg KG, TNF 15 μ g/kg KG, NaCl) gut vertragen. Wie schon im Modell der isolierten hepatischen Perfusion, zeigten auch die Versuchstiere der hepatischen arteriellen Infusion bei der Relaparotomie einen annähernd runden, durchschnittlich 5mm großen Tumor. Keines der Tiere zeigte während der 10tägigen Tumorwachstumsphase Auffälligkeiten bezüglich seines Fress- oder Putzverhaltens. Ebenso entstanden durch den Tumorprogress keine Gewichtsverluste. Bei der Untersuchung des offenen Abdomens vor Durchführung der Versuche fand sich bei keiner der WAG-Ratten ein Hinweis auf eine intraperitoneale Tumoraussaat.

6.2.2. Modell der HAI

Die HAI konnte bei allen Tieren komplikationslos durchgeführt werden. Alle Tiere überlebten den Versuchsablauf ebenso wie die komplette Nachuntersuchungszeit. Die Kanülierung der A. carotis communis sowie der A. gastroduodenalis verliefen problemlos. Unter Sicht auf die Gefäßverhältnisse bei dem Einstrom von TNF bzw. NaCl konnte durch immer gleichen Infusionsdruck die korrekte Flussrichtung über die A. hepatica in die Leber kontrolliert werden. Die Kreislaufüberwachung der Tiere zeigte keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Der mittlere arterielle Druck (TNF 30 μ g/kg KG 123 \pm 11mmHg vs. TNF 15 μ g/kg KG 121 \pm 3mmHg vs. Kontrolle 121 \pm 9mmHg) und die Herzfrequenz lagen zu Anfang des Versuches im Normbereich. Der Blutdruck fiel vom Beginn des Beobachtungszeitraums von 180 Minuten bis zum Versuchsende gering ab (Abbildung 26A). Der Basenüberschuss, der den Säure-Base-Haushalt widerspiegelt, wurde ebenfalls engmaschig gemessen. Zwischen den einzelnen Gruppen konnten hier keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden. Ähnlich den Werten beim IHP-Modell fiel er auch im HAI-Modell über die Zeit deutlich ab (Abbildung 26B). Der pH-Wert wiederum blieb in engen Grenzen über den gesamten Zeitraum konstant (Daten nicht dargestellt).

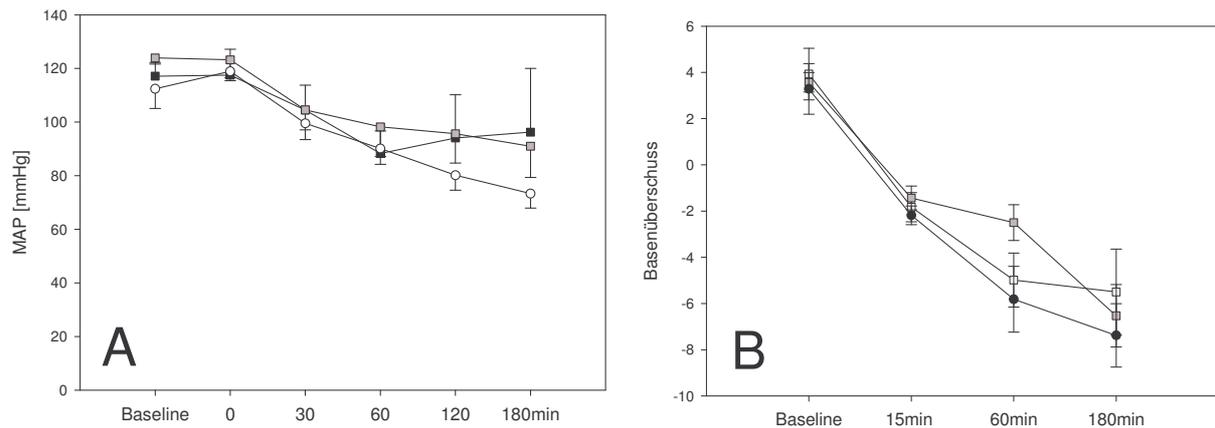


Abbildung 26A, B: Mittlerer arterieller Blutdruck (A) und Basenüberschuss (B). TNF 15µg/kg KG (■) vs. TNF 30µg/kg KG (■) vs. NaCl (□). Mittelwert ± SEM.

6.2.3. Intravitalmikroskopie

6.2.3.1. Perfusion der Sinusoide und Tumorkapillaren

Der Einfluss der arteriellen Infusion von TNF- α auf die hepatische Mikrozirkulation war vergleichbar mit dem der isolierten Perfusion. Der Effekt war dosisabhängig. So führte die Infusion von Beromun® schon initial zu einem Perfusionsausfall von $35.7 \pm 9.3\%$ (15µg/kg KG) bzw. $43.3 \pm 10.7\%$ (30µg/kg KG) der Tumorkapillaren, während die Kontrollgruppe lediglich einen Ausfall von $5.9 \pm 2.3\%$ aufwies ($p < 0.05$). Nach 180 Minuten waren in der höherdosierten Gruppe $88.1 \pm 5.2\%$ und in der niedrigdosierten $42.5 \pm 13.6\%$ nichtperfundierte Tumorkapillaren zu finden ($p < 0.05$). In der Sham-infundierten Kontrollgruppe hingegen waren nur geringfügige Änderungen des Perfusionsausmaßes im Tumor zu verzeichnen (Abbildung 27B). Die sinusoidale Mikrozirkulation der benachbarten tumorfreien Leber war, wie schon beim IHP-Modell, nicht von diesem TNF- α -induzierten Effekt betroffen. Unter der Dosis von 30µg/kg KG des TNF- α fand sich ein Perfusionsausfall von lediglich $3.0 \pm 3.0\%$, unter 15µg/kg KG ergaben sich gar Werte von $0 \pm 0\%$ und bei Infusion von NaCl fand man einen Perfusionsausfall bei $1.6 \pm 1.0\%$ der Sinusoide (Abbildung 27A). Auch zum Ende des Versuchs änderten sich die Werte im Lebergewebe nicht merklich.

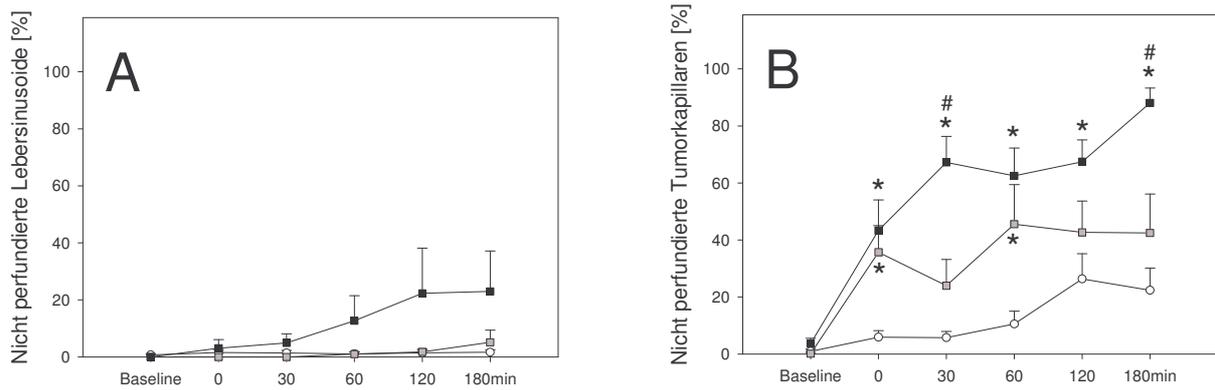


Abbildung 27A, B: Perfusionsausfall in Lebersinusoiden (A) und Tumorkapillaren (B) nach HAI. Alle Angaben in %. TNF 15µg/kg KG (■) vs. TNF 30µg/kg KG (●) vs. NaCl (□). Mittelwert ± SEM. * $p < 0.05$ versus Kontrollgruppe; # $p < 0,05$ versus 15µg/kg KG.

6.2.3.2. Flussgeschwindigkeit in Lebervenen und Tumorgefäßen

Neben dem Perfusionsausfall wurde wiederum die Flussgeschwindigkeit in den Lebervenen und Tumorgefäßen gemessen. Vergleichbar den Ergebnissen nach IHP zeigte sich auch nach HAI ein kontinuierlicher Rückgang der Flussgeschwindigkeit über die 3stündige Untersuchungszeit. Erneut war dieser Effekt in den malignen Gefäßen deutlicher als in den Gefäßen der Leber ausgeprägt. Ebenso lies sich eine weitere Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit bei den TNF-behandelten WAG-Ratten verzeichnen (Abbildung 28A, B). So ging die Flussgeschwindigkeit im Tumor der 30µg/kg KG-Gruppe zum letzten Messzeitpunkt annähernd gegen Null, obwohl diese Tiere zum selben Zeitpunkt den höchsten arteriellen Mitteldruck im Vergleich zu den anderen Gruppen aufwiesen (siehe Abbildung 26A).

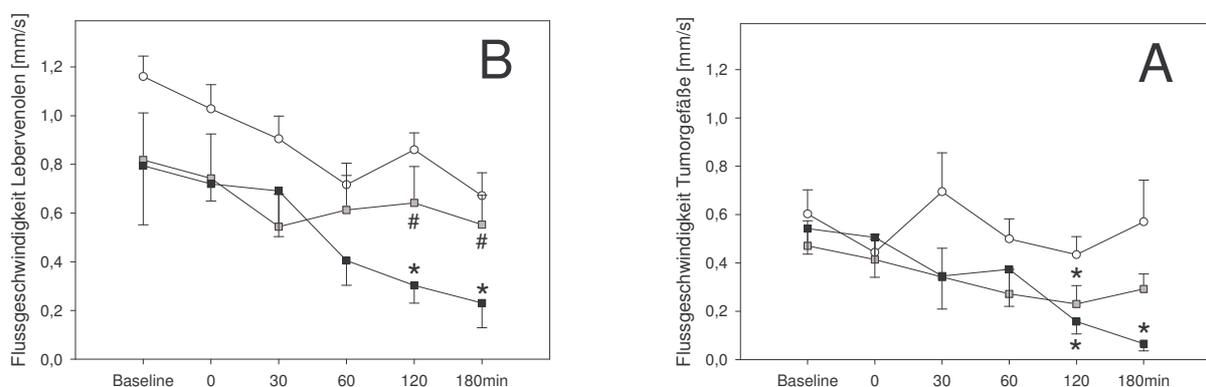


Abbildung 18 A, B: Flussgeschwindigkeit der Blutkörperchen in den Lebervenen (A) und des Tumors (B) nach HAI. TNF-Infusion von 15µg/kg KG (■) vs. 30µg/kg KG (●) vs. NaCl-Kontrolle (□). Mittelwert ± SEM. * $p < 0.05$ versus NaCl-Kontrolle; # $p < 0,05$ versus 30µg/kg KG.

Insgesamt fanden sich signifikante Unterschiede erst 120 Minuten nach Ablauf der HAI. Bei der Betrachtung der Flussgeschwindigkeit in den Lebervenenolien zeigten sich signifikante Unterschiede beim Vergleich der 30µg/kg Gruppe zur niedriger dosierten als auch zur Kontrollgruppe, so dass hier von einem dosisabhängigen Effekt ausgegangen werden muss. In den Tumorgefäßen zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren, ohne dass innerhalb der beiden TNF-Gruppen statistisch signifikante Differenzen zu finden waren.

6.2.3.3. Leukozytenadhärenz

Die Untersuchung der leukozytären Adhärenz wurde in den größeren Leber- und Tumorgefäßen wie auch in den Sinusoiden und Kapillaren vorgenommen. In den Tumorkapillaren fand sich eine von der TNF-Konzentration abhängige Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Interessanterweise war in der Gruppe der HAI mit 15µg/kg KG TNF-α deutlich mehr Leukozyten adhärenz als in der 30µg/kg KG-Gruppe, welche kaum einen Unterschied zu den Kontrolltieren aufwies (Abbildung 29B). In den Sinusoiden war über die gesamte Zeitspanne unabhängig von der applizierten Substanz oder dessen Dosierung nur eine geringe Anzahl adhärenz Leukozyten zu beobachten (Abbildung 29A).

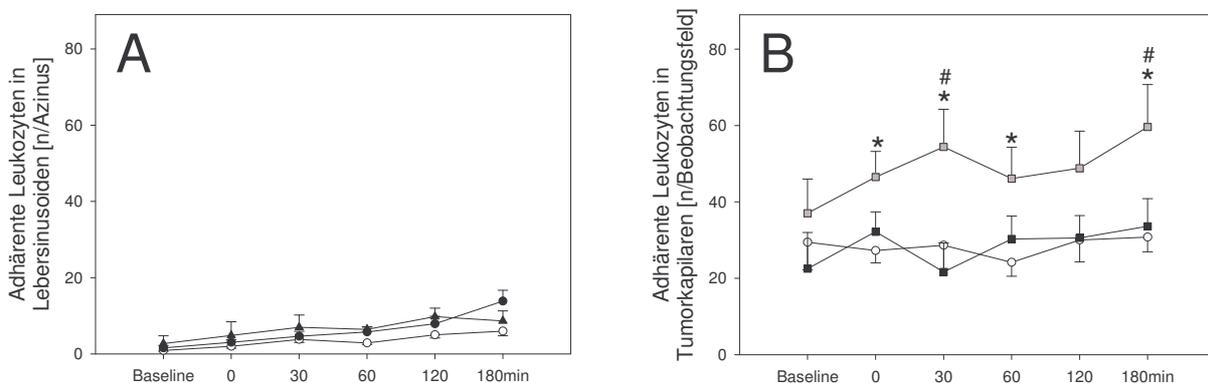


Abbildung 29A, B: Leukozytenadhärenz in Lebersinusoiden (A) und Tumorkapillaren (B) nach HAI. Angaben als Absolutwerte bezogen auf die jeweilige Beobachtungseinheit. 15µg/kg KG TNF-α (●) vs. 30µg/kg KG TNF-α (■) vs. NaCl-Kontrolle (□). Mittelwert ± SEM. *p<0,05 versus NaCl-Kontrolle; # p<0,05 versus 30µg/kg KG.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Leber- und Tumorvenolen waren mit denen der Sinusoide und Kapillaren erwartungsgemäß vergleichbar. Nach hepato-arterieller Infusion mit 15µg/kg KG TNF-α fanden sich signifikant mehr adhärenz Leukozyten als bei den Tieren der NaCl-Kontrollgruppe (654±131 vs. 216±99 Leukocyten/mm² Venenwand; p<0,05). Nach kurzzeitigem Abfall der Leukozytenzahl 30 bis 60 Minuten nach der Infusion

nahm die Adhärenz bis zum Ende des Versuchs stetig zu (1256 ± 218 vs. 324 ± 75 , $p < 0,05$). Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Tumorvenolen war erneut in der niedriger dosierten Gruppe stärker ausgeprägt, so dass es hier keinen linearen Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung gab (Abbildung 30B). Das benachbarte Lebergewebe zeigte wiederum nur wenige dem Endothel anhaftende Leukozyten unter der TNF- α -basierten HAI, jedoch signifikante Differenzen zu den Kontrolltieren (Abbildung 30A).

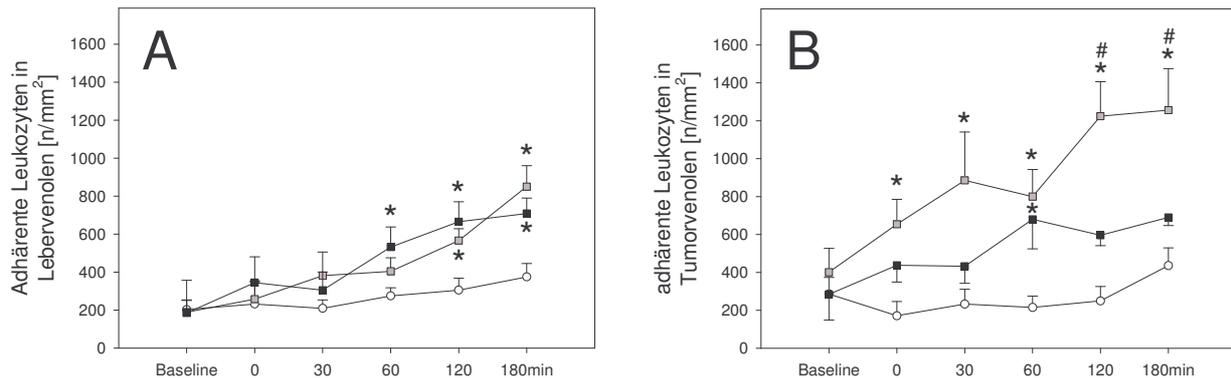


Abbildung 30A, B: Analyse der Leukozytenadhärenz in Venolen von Leber (A) und Tumor (B). Angaben der an der Gefäßwand haftenden Leukozyten in n/mm². 15 µg/kg KG TNF- α (■) vs. 30 µg/kg KG TNF- α (▲) vs. NaCl-Kontrolle (□). Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$ versus Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. 30 µg/kg KG TNF- α .

6.2.4. Histologie

6.2.4.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)

Die Untersuchungsparameter (Grobschelligkeit, Vakuolisierung, Zellkerndeformation und sinusoidale Kongestion) der HE-Schnitte nach HAI waren ebenfalls mit denen der IHP vergleichbar. Es zeigte sich, gemäß den Ergebnissen nach isolierter Perfusion, auch nach Infusion kein Hinweis auf eine wesentliche Schädigung des Lebergewebes. Es konnten keinerlei signifikante Veränderungen der Lebermorphologie eruiert werden, unabhängig davon ob die HAI mit TNF- α in einer Dosierung von 15 bzw. 30 µg/kg KG oder mit Kochsalz durchgeführt wurde (Tabelle 2).

	TNF-a		NaCl	
	15µg/kg KG	30µg/kg KG		
Grobscholligkeit	18.9±9.2%	28.6±10.1%	32.6±9.9%	N.S.
Vakuolisierung	2.3±1.7%	0.0±0.0%	0.6±0.6%	N.S.
Zellkerndeformation	1.7±1.7%	0.0±0.0%	4.6±2.2%	N.S.
Sinusoidale Kongestion	8.6±3.9%	5.7±4.4%	1.7±1.7%	N.S.

Table 2: *Histomorphologische Veränderungen im Lebergewebe nach hepato-arterieller Infusion. Angaben in Prozent. Mittelwert ± SEM.*

Die histologischen Veränderungen (nach Calabrese) waren zum überwiegenden Teil nur leicht und in einer geringen Anzahl der Fälle mäßig ausgeprägt.

Die Analyse der Endothelablösung, der Fibrinablagerung sowie der Erythrozytenadhärenz ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen. Interessanterweise fanden sich in der Gruppe mit 15µg TNF- α eine geringfügig höhere Anzahl an Fibrin-Clots und adhärennten Erythrozyten im Vergleich zur höher dosierten Gruppe. Diese hingegen wies etwas mehr Endothelschäden auf. Insgesamt konnte nach HAI keine relevante Veränderung der untersuchten Lebergefäße festgestellt werden (Abbildung 31).

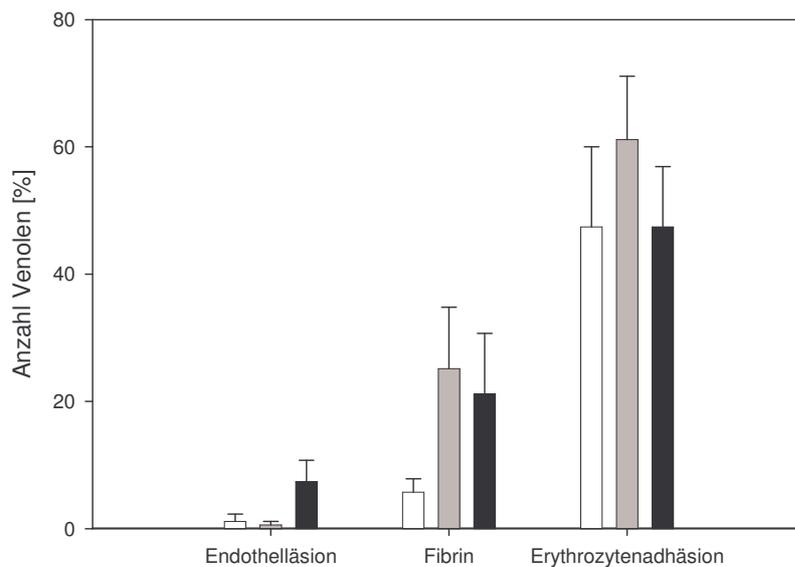


Abbildung 31: Quantitative Analyse der vaskulären Läsionen. Endothelläsion, Fibrin-Ablagerungen und adhärenente Erythrozyten in Lebervenen (angegeben in Prozent aller untersuchten Venolen in 25 HPF pro HE-Schnitt) 180 Minuten nach Kochsalz-(□) oder TNF- α -basierter (15µg/kgKG ■, 30µg/kgKG ■) Arteria hepatica- Infusion. Mittelwert \pm SEM

6.2.4.2. AS-D Chloracetatesterase (CAE)

Die quantitative Analyse der Leukozyteninfiltration im Bereich der Lebergefäße mit Hilfe der CAE-Färbung erbrachte signifikante Unterschiede zwischen den TNF-behandelten Tieren und denen der NaCl-Kontrollgruppe. Bei der genauen Differenzierung in sinusoidales Stromgebiet, Portalfeld und Venolen zeigten beide Dosierungen jeweils einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Im Falle der Venolen zeigte sich sogar ein signifikanter Unterschied der 30µg/kg KG-Gruppe zur 15µg/kg KG-Gruppe. Wurde die HAI also mit NaCl durchgeführt fanden sich durchweg weniger Leukozyten. Bei hepato-arterieller Infusion von TNF- α waren in allen drei untersuchten Gebieten signifikant mehr Leukozyten nachzuweisen. Erneut fand sich eine Dosisabhängigkeit, da jeweils mehr Leukozyten in der höher dosierten TNF-Gruppe zu finden waren, ohne dass dies jedoch statistisch signifikant war (Abbildung 32).

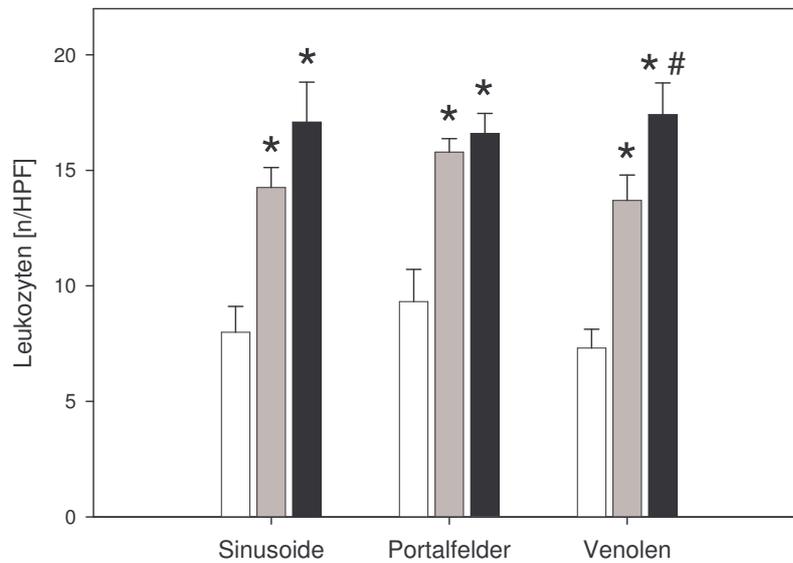


Abbildung 32: Anzahl der CAE-gefärbten Leukozyten im Bereich der Lebergefäße 3h nach HAI mit NaCl- (□) oder TNF- α (15µg/kg KG ■, 30µg/kg KG ■). Einteilung in Sinusoide, Portalfelder und Venolen (Angaben in Zellen/HPF) Mittelwert \pm SEM; * p <0,05 versus Kontrollgruppe; # p <0,05 versus 15µg/kg KG TNF- α .

6.2.5. Immunhistochemie

6.2.5.1. Apoptoseindex, Caspase-3

Der Apoptosemarker Caspase-3 wurde wie schon bei der isolierten hepatischen Perfusion zur Quantifizierung apoptotischer Zellen in Leber und Tumor herangezogen. Wie schon bei der IHP zeigte sich auch nach HAI eine hochsignifikante Zunahme des Apoptoseindex nach TNF-Infusion spezifisch in den Tumorzellverbänden. Es fanden sich 13 ± 2 (15µg/kg KG) und 15 ± 2 (30µg/kg KG) apoptotische Zellen pro HPF. Die Werte in der NaCl-Kontrollgruppe waren jeweils signifikant niedriger. Im Tumor waren es lediglich 6 ± 1 apoptotische Zellen pro HPF (p <0,05), (Abbildung 33).

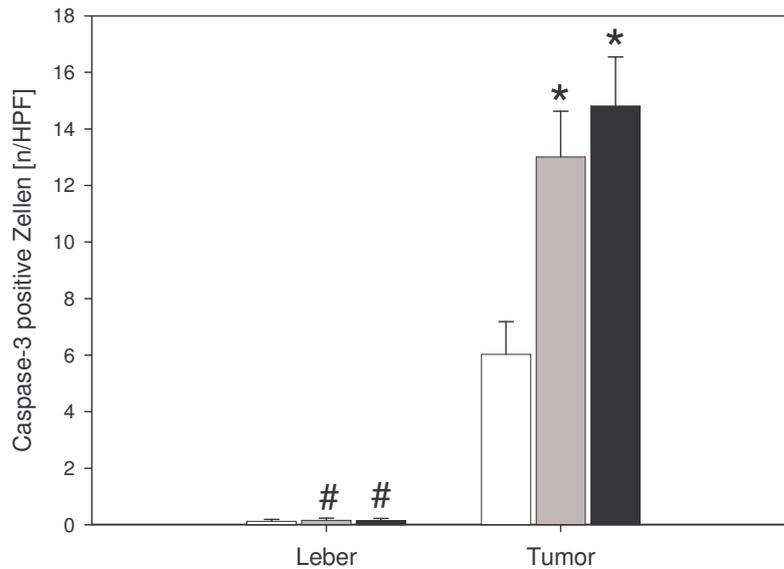


Abbildung 33: Apoptoseindex anhand Caspase-3-positiver Zellen im Tumor und der benachbarten normalen Leber 3h nach HAI (Angaben als Anzahl pro HPF). 15µg/kg KG TNF-α (■) vs. 30µg/kg KG (■) vs. NaCl-Kontrolle (□). Mittelwert ± SEM; *p<0,05 versus NaCl-Kontrolle; #p<0,05 versus Tumorgewebe.

6.2.5.2. Proliferationsindex, PCNA

Die Analyse der Proliferation zeigte erwartungsgemäß einen hohen Index im Tumorgewebe. Die Leber selbst wies eine niedrige Proliferationsrate auf. 180 Minuten nach HAI waren signifikante Unterschiede zwischen Leber und Tumor zu finden (Abbildung 34).

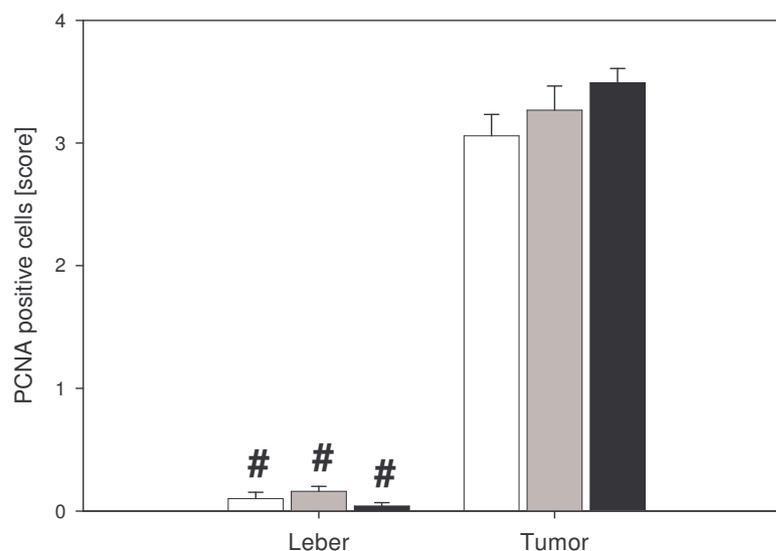


Abbildung 34: Proliferationsindex in Leber- und Tumorgewebe. Die Angaben sind als Index von 1-4 wiedergegeben (Index: 0 = <1%, 1 = 1-10%, 2 = 10-30%, 3 = 30-50%, 4 >50%). 15µg/kg KG TNF-α (■) vs. 30µg/kg KG (■) vs. NaCl (□). Mittelwert ± SEM; #p<0,05 versus Tumorgewebe.

6.2.6. Laborchemische Parameter

6.2.6.1. Leberenzyme

Die Messung der Leberenzyme (ASAT, ALAT, LDH) zur Beurteilung einer etwaigen Hepatozytenschädigung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Tieren der NaCl-, TNF 15µg/kg KG- und TNF 30µg/kg KG-Gruppen. Es kam lediglich zu einer geringen LDH-Erhöhung durch die hepatisch-arterielle Infusion, die in der Kontrollgruppe den höchsten Peak zeigte. Alles in allem war bei der Untersuchung der Leberenzyme keine relevante hepatozelluläre Schädigung zu detektieren (Abbildung 35).

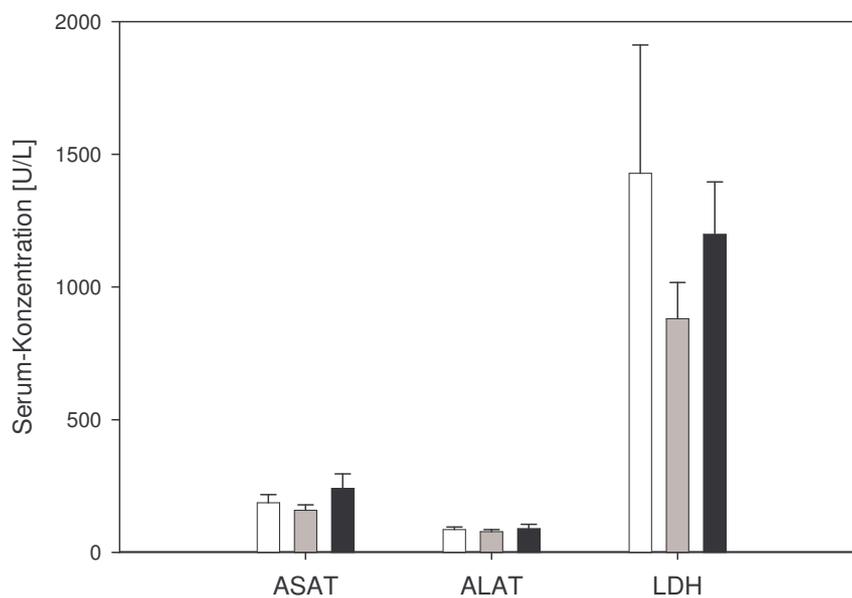


Abbildung 35: Leberenzyme ASAT, ALAT, LDH 180min nach HAI. Vergleich von NaCl-Kontrollgruppe (□), 15µg/kg KG TNF-α (■) und 30µg/kg KG TNF-α (■). Mittelwert ± SEM.

6.2.6.2. Zytokine

Die sekundäre Zytokinantwort als Reaktion auf den Reiz der HAI wurde aus dem Rattenserum 180 Minuten nach der Infusion bestimmt. Untersucht wurden mit IL-6, IL-8 und IL-10 sowie dem Ratten-eigenen TNF-α, die gleichen Zytokine wie schon zuvor im IHP-Versuch. Es zeigte sich, dass die Zytokinantwort der Tiere unter Applikation von TNF-α deutlich anders ausfiel als bei Sham-Infusion. So wurde nach TNF-α-basierter HAI eine signifikant höhere Serumkonzentration des endogenen Ratten-TNF-α im Vergleich zur Kochsalz-Kontrolle gemessen ($p < 0,05$). Außerdem war der Serumspiegel des proinflammatorischen Interleukin IL-6 signifikant erhöht ($p < 0,05$). Demgegenüber war die IL-8 Konzentration signifikant erniedrigt ($p < 0,05$), obwohl es ebenso zu den

proinflammatorischen Zytokinen gerechnet wird. Das anti-inflammatorische IL-10 zeigte wiederum eine, wenn auch nicht signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Kontrolltieren. Zieht man die Ergebnisse der isolierten hepatischen Perfusion zum Vergleich heran, so findet man nach HAI einen deutlichen Unterschied in der Zytokinantwort. Bei alleiniger Betrachtung der beiden TNF- α Dosierungen im HAI-Modell zeigte die niedrigere Dosierung durchweg eine geringere Ausprägung der sekundären Zytokinantwort. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich jedoch nicht (Abbildung 36A-D).

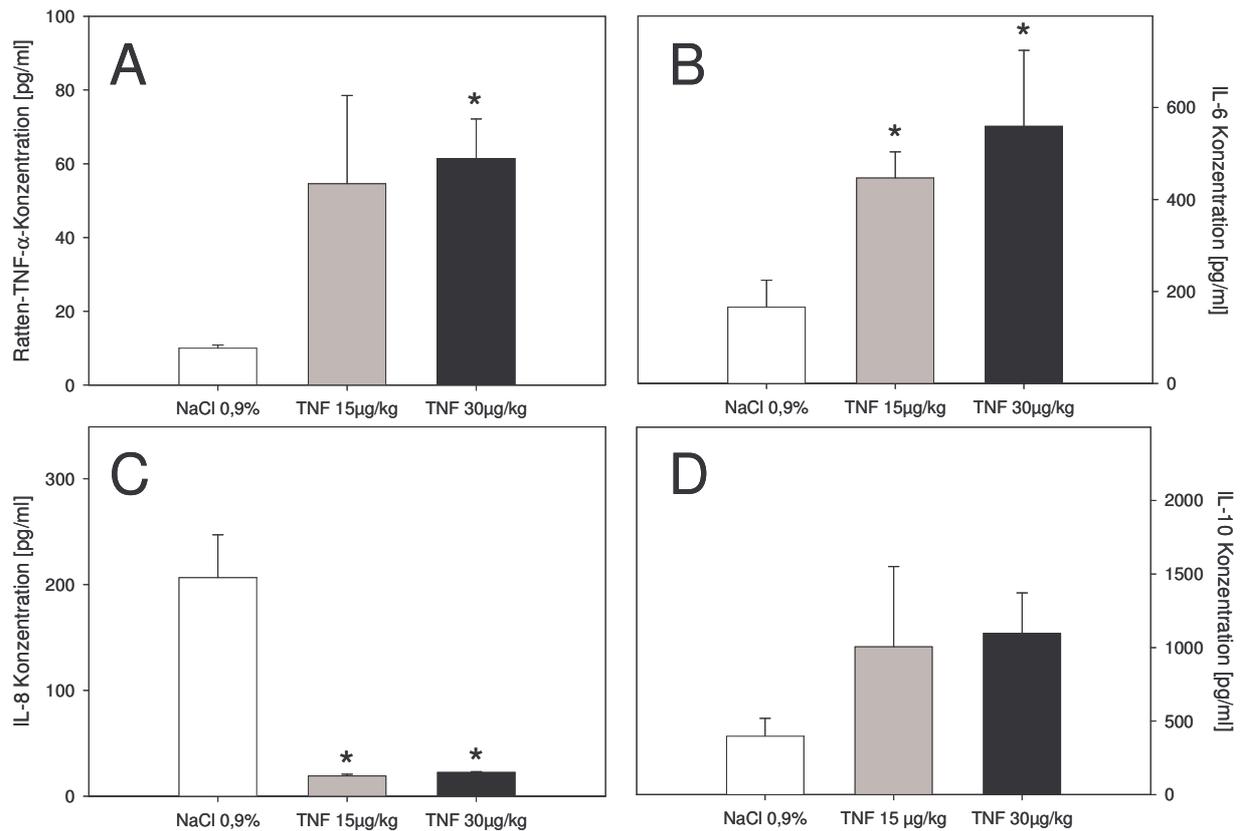


Abbildung 36: Serumkonzentrationen verschiedener Zytokine 3h nach HAI. Dargestellt sind Ratten-TNF- α (A), Interleukin-6 (B), Interleukin-8 (C) und Interleukin-10 (D). Kochsalz- (\square) vs. TNF- α -basierte (15 μ g/kg KG \blacksquare , 30 μ g/kg KG \blacksquare) Arteria hepatica Infusion. Mittelwert \pm SEM; * p <0,05 versus NaCl-Kontrolle.

6.2.6.3. Transhepatische TNF-alpha-Passage

Zur Messung des - nach Leberpassage - in den systemischen Rattenkreislauf übergetretenen TNF- α , wurde dessen Konzentration im Serum bestimmt. Um den Verlauf über die Zeit beurteilen zu können, wurden Messungen 15 und 180 Minuten nach HAI durchgeführt. Nach 15 Minuten konnten bei einer Dosis von 15 μ g/kg KG 32.2 \pm 1.9ng/ml und bei einer Dosis von 30 μ g/kg KG 36.4 \pm 2.2ng/ml gemessen werden. Nach 180 Minuten wurden Serumkonzentrationen von 9.0 \pm 0.6ng/ml und 8.4 \pm 1.1ng/ml gemessen (Abbildung 37). 15 Minuten nach Perfusion waren also 16-18% des applizierten TNF im systemischen Kreislauf und am Ende des Versuchs lediglich 4-5% nachweisbar. Auffällig hierbei war, dass sich kaum ein Messunterschied beim Vergleich der beiden Dosierungen finden ließ. Nach 180 Minuten war der TNF-Spiegel im Serum der Versuchstiere der 15 μ g/kg KG-Gruppe durchschnittlich sogar minimal höher als der der 30 μ g/kg KG-Gruppe.

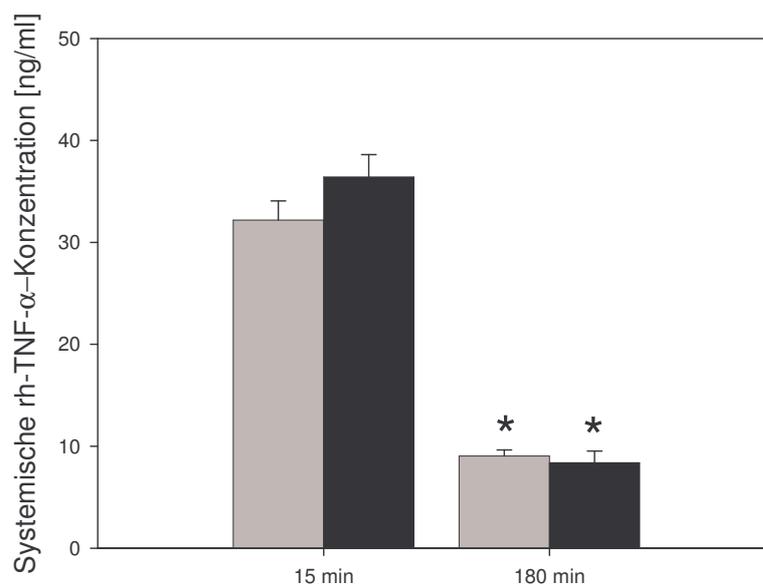


Abbildung 37: rh TNF- α -Konzentration 15 und 180 Minuten nach HAI. Alle Angaben in ng/ml. TNF 15 μ g/kg KG (■) vs. TNF 30 μ g/kg KG (■). Mittelwert \pm SEM; * p <0.05 versus 15 Minuten.

7. DISKUSSION

Die vorliegende Studie diente der detaillierten quantitativen in vivo Analyse mikrozirkulatorischer Störungen in Tumorgefäßen sowie in Sinusoiden und Venolen der dem Tumor benachbarten Leber nach isolierter Organperfusion oder arterieller Infusion von Tumornekrosefaktor-alpha mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Außerdem wurden Apoptose, Gewebeproliferation, Zytokin- und Enzymfreisetzung sowie die Makrohämodynamik untersucht. Ziel der Studie war es, TNF-alpha-bedingte Mechanismen der selektiven Wirkung dieser Substanz auf Tumorgewebe aufzuschlüsseln. Alle Experimente wurden an spontanatmenden, anästhesierten und median laparotomierten Ratten durchgeführt.

Untersuchungen pathophysiologischer Mechanismen der hepatischen Mikrozirkulation können anhand isolierter Zellen bzw. Zellkulturen [Oda et al., 1990; Babbs et al., 1991; Jaeschke et al., 1992; Mayadas et al., 1993], isoliert perfundierten Organen [Konno et al., 1992; Lindert et al., 1992] oder intakten Organismen [Ferguson et al., 1993; Harris and Skalak, 1993; Menger et al., 1991] erfolgen. Dabei sollte das jeweilige Modell problembezogen ausgewählt werden [Wortha and Adams, 2007]. Das bedeutet, dass man in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Fragestellung und den im Vorfeld formulierten Hypothesen ein passendes Experiment auswählt bzw. erarbeitet. In der vorliegenden Arbeit wurden eigens zwei Versuchsmodelle zur Applikation der zu analysierenden Substanz untersucht. Beides sind in vivo Modelle und haben somit qualitativ einen ganzheitlichen Charakter. Im Gegensatz zu Modellen die eine Aufklärung einzelner zellulärer Mechanismen [Hashimoto et al., 1994; Muller et al., 1993] oder Zell-Zell-Interaktionen [Bargatze et al., 1994] durch die Reduktion der Betrachtung auf isolierte Zellen, Zellverbände, Gewebe oder Organe anstreben, wird bei dieser Art der Analyse der komplette Organismus mit einbezogen. Vorteil von in vivo Modellen ist die Möglichkeit typische Interaktionen zwischen einzelnen Organsystemen, interferierenden lokalen und systemischen, positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen in der Regulation und Kontrolle komplexer physiologischer oder pathophysiologischer Prozesse [Menger and Lehr, 1993] sowie neuronale Steuerungsmechanismen, metabolische Faktoren und humorale Kaskadensysteme erfassen zu können [McCuskey, 1986].

7.1. Diskussion von Material und Methoden

7.1.1. Chirurgische Präparation und Tumorimplantation

In der vorliegenden Studie wurden WAG-Ratten für die einzelnen Versuche genutzt. Diese Tiere eignen sich aufgrund des syngeneten Hintergrunds in idealer Weise zur Implantation der CC531-Tumorzellen. Die in dieser Arbeit verwendete Implantationstechnik wird auch von anderen Arbeitsgruppen genutzt [Rothbarth et al., 2003] und ist von Kollmar et al. ausführlich beschrieben worden [Kollmar et al., 2004]. Andere Implantationsmöglichkeiten sind die Injektion der Tumorzellen in die Vena Porta und Einschwemmen derselben in das Lebergewebe [Scheringa et al., 1989], oder die subkapsuläre Implantation von kleineren Tumorfragmenten in die Leber [van Etten et al., 2003; 2004; Ijzermans et al., 1992]. Der Nachteil der portalvenösen Injektion ist die unkontrollierte Aussaat des Tumormaterials in der Leber. Der Weg der hämatogenen Metastasierung wird durch dieses Modell jedoch wirklichkeitsgetreuer nachgeahmt. Zur Erstellung intravitalmikroskopischer Aufnahmen bedarf es jedoch eines spezifisch lokalisierten und weitgehend reproduzierbaren Tumolvolumens. Bei portalvenöser Injektion kann dies aufgrund der intrahepatischen Streuung der Zellen nicht gelingen. Die Tumorfragmentimplantation hingegen bietet zwar ein relativ exaktes Gewebevolumen, berücksichtigt aber kaum die physiologischen Bedingungen von Tumorwachstum, Neoangiogenese und Vaskularisierung. Das von Kollmar et al. beschriebene Modell bietet somit einen guten Kompromiss zwischen reproduzierbarer lokaler Implantation und Gewährleistung möglichst physiologischer Bedingungen.

Die WAG-Ratten sind neben ihrer für die Tumorimplantation notwendigen genetischen Definition aufgrund ihrer Körpergröße gut geeignete Versuchstiere. Bei einem mittleren Gewicht von 300 bis 350g bringen sie gute Voraussetzungen für die mikrochirurgische Präparation und die darauf folgende intravitalmikroskopische Untersuchung mit. Zudem weisen die Tiere eine hohe Stressresistenz auf, welche den Operationsteil des Versuches sowie den Ablauf der Nachuntersuchung wesentlich erleichtert. Da sich in dieser Studie die Nachuntersuchungszeit unmittelbar der Präparation anschloss, handelte es sich um ein Akutmodell. Hier gilt es zu berücksichtigen, dass die Physiologie des Organismus, insbesondere der Mikrozirkulation durch das chirurgische Trauma alteriert werden kann [Szczeny et al., 2000; Tuominen et al., 1995]. Um dem entgegenzuwirken, wurde die Präparation unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops und mikrochirurgischen Instrumenten in möglichst schonender Weise durchgeführt.

7.1.2. Isolierte hepatische Perfusion (IHP)

Das Verfahren der isolierten Leberperfusion im Tierversuch ist bereits vielfach vorbeschrieben. Mehrere Untersuchungen in Großtieren wurden unternommen, um systemische Nebenwirkungen wie arterielle Hypotonie oder Leckagen aufzeigen zu können [Borel Rinkes et al., 1997; de Vries et al., 1998; de Vries et al., 2003]. Da eine Tumorumplantation bisher nur im Kleintiermodell möglich ist, gelingt es auch nur hier die pharmakologischen Auswirkungen bestimmter Stoffe auf das Tumorgewebe zu untersuchen.

Schon 1988 erarbeiteten de Brauw et al. ein Lebermetastasenmodell mit isolierter hepatischer Perfusion an der Ratte. Die Arbeitsgruppe applizierte 5-Fluorouracil und untersuchte die Konzentrationen des Stoffes im Tumorgewebe [de Brauw et al., 1988]. Der Zufluss des hier verwendeten Perfusionssystems erfolgte zeitgleich über die A. hepatica und die Pfortader. Ähnliche Untersuchungen folgten von anderen Arbeitsgruppen. Radnell et al. verwendeten ebenfalls 5-FU und wiesen dessen antitumorösen Effekt nach [Radnell et al., 1990]. Eine 2000 veröffentlichte Studie von Nakamoto et al. untersuchte die Wirkung von TNF- α in einem solchen Setting. Man stellte erneut fest, dass die isolierte Perfusion zur onkologischen Therapie hepatischer Filiae einen attraktiven Therapieansatz bedeutet, es aber noch kein Perfusionsmodell mit Tumornekrosefaktor alpha vorliegt. Die Arbeitsgruppe um Nakamoto modifizierte das Experiment von de Brauw et al., wobei sie jedoch den doppelten Zufluss über A. hepatica und V. porta beibehielten. Letztlich fanden sie eine, im Vergleich zur IHP im Schweinemodell, hohe Leckagerate mit relevanter Hepatotoxizität, die jedoch immer noch tolerabel war. Die maximale systemische TNF- α -Konzentration betrug 200ng/ml. Die Wahl des Zuflusses über Leberarterie oder Pfortader schien keinen Einfluss auf die Toxizität zu haben. Das eigentliche Modell befanden Nakamoto und Mitarbeiter für gut geeignet weitere Studien zur Bestimmung der regionalen und systemischen Wirkung von TNF durchzuführen [Nakamoto et al., 2000b].

Im gleichen Jahr zeigten Van Ijken et al. ebenfalls im de Brauw'schen Ratten-IHP-Modell, dass die Kombination von TNF- α und Melphalan im Perfusat einen deutlich höheren Antitumoreffekt aufwies als eine Melphalangabe alleine [van Ijken et al., 2000a].

Im Jahre 2002 entwickelten Rothbart et al. eine Ratten-IHP, bei der die Perfusion sowohl über die Pfortader (orthograd) als auch über die V. cava (retrograd) durchgeführt wurde. Melphalan wurde jeweils über A. hepatica hinzugegeben. Verglichen mit der orthograden IHP zeigte die retrograde IHP eine höhere Aufnahme des Melphalans im Tumor bei potentiell niedriger Lebertoxizität [Rothbarth et al., 2002].

2003 veröffentlichten van Etten und seine Mitarbeiter ebenfalls eine Arbeit zur IHP mit TNF- α und Melphalan an der Ratte. Sie untersuchten die Auswirkungen auf Metastasen eines Kolonkarzinoms (CC531), eines Osteosarkoms (ROS-I) und eines Weichteilsarkoms (BN-175). Diese drei Tumorentitäten unterscheiden sich vor allem durch ihre Vaskularisierung. In der CC531-Zelllinie des Kolonkarzinoms war der TNF-Effekt, aufgrund der geringen mikrovaskulären Gefäßdichte nur vermindert oder gar nicht nachweisbar [van Etten et al., 2003]. Die Autoren folgerten daraus einen direkten Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte des jeweiligen Tumors und einer etwaigen Wirkung des TNF- α .

Das Perfusionsmodell der vorliegenden Studie ist nahezu identisch mit dem van Etten'schen Ansatz. Da die Blutversorgung von Lebertumoren bzw. Lebermetastasen hauptsächlich durch den arteriellen Schenkel der Leberversorgung geleistet wird [Breedis and Young, 1954] ist dieser Zuflussweg - verglichen mit dem Modell von de Brauw - effektiver um mit hoher Selektivität das Tumorgewebe zu erreichen. Wie bereits im obigen Abschnitt erwähnt, implantierte die Gruppe um van Etten 1 x 2mm² Tumorfragmente unter die Leberkapsel. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tumormodell wird den physiologischen Bedingungen jedoch eher gerecht, da das Tumorstadium erst nach Zellimplantation beginnt und somit möglicherweise eine ausgeprägtere Neoangiogenese des Tumors nach sich zieht. Zudem gilt es zu bedenken, dass das vorliegende Modell einen Akutversuch darstellt, die Ergebnisse also unmittelbar nach Medikamentenapplikation gewonnen wurden. Die Messungen von van Etten et al. [Breedis and Young, 1954] hingegen wurden jeweils mehrere Tage nach der IHP vorgenommen.

7.1.3. Hepato-arterielle Infusion (HAI)

Die HAI stellt eine Vereinfachung der IHP dar, die jedoch zusätzlich zu ihrem lokalen Effekt systemische Auswirkungen haben kann. Somit stehen in diesem Verfahren ungewünschte Nebeneffekte auf die Mikro- und Makrohämodynamik einer Minderung der operativen Mortalität und Morbidität gegenüber. Experimentelle Daten zur HAI, insbesondere mit Applikation von TNF- α , liegen nur in geringer Anzahl vor. Wegen des Übertritts des Medikaments in den systemischen Kreislauf und den damit verbundenen Nebenwirkungen halten viele Autoren dieses Modell für nicht praktikabel. Ähnlich dem IHP-Setting stellt sich zudem erneut die Frage, ob die A. hepatica den bestmöglichen Infusionsweg darstellt. Neben der bereits angeführten Tatsache, dass Lebermalignome ihre Blutversorgung vorwiegend über den arteriellen Zufluss erhalten, konnten weitere Vorteile der HAI gegenüber einer systemischen i.v.-Gabe oder gar einer portalvenösen Infusion gezeigt werden. 1998 veröffentlichten Okuno et al. eine Studie in der sie den effektivsten Weg der Administration von 5-Fluorouracil in die Leber von Wistar-Ratten untersuchten. Die Autoren

verglichen den Zugang über die A. hepatica mit einem portalvenösen und einem über eine periphere Vene im Schwanzbereich der Tiere. Die Gefäße wurden jeweils kanüliert und nach Verabreichung von 5-FU eine ^{19}F -NMR-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy) durchgeführt, um die Signalstärke des Medikaments im Lebergewebe quantifizieren zu können. Erfolgte die Gabe über die Arterie, konnte 5-FU über eine wesentlich längere Zeit in hoher Konzentration in der Leber nachgewiesen werden. Der initiale Anstieg war in den Gruppen der arteriellen und portalvenösen Infusion etwa gleich hoch, fiel aber im HAI-Versuch wesentlich langsamer ab. Okuno und Mitarbeiter führen diesen Effekt auf einen längeren 5-FU-Verbleib in den peribiliären Plexus zurück [Okuno et al., 1998].

Der hepatische Blutfluss besteht zu ca. 70% aus dem portalvenösen und zu etwa 30 % aus dem arteriellen Fluss. Burkel zeigt schon 1969 an der Ratte, dass die Äste der Pfortader direkt in die Sinusoide drainieren, wohingegen das arterielle Blut teils in die peribiliären Plexus und erst dann in die Sinusoide fließt [Burkel, 1969]. In diesem Mechanismus könnte ein weiterer Vorteil der HAI gegenüber anderen Applikationsformen zu sehen sein. Takasaki und Hano fanden gleiche Mechanismen am Menschen und veröffentlichten ihre Ergebnisse in einer Arbeit von 2001 [Takasaki et al., 2001]. Ein Jahr zuvor stellten Gonda et al. fest, dass metastatische Lebertumoren nicht nur den Großteil ihres Blutvolumens aus den arteriellen Ästen erhalten, sondern ganz überwiegend aus jenen die den Umweg über die peribiliären Plexus gehen [Gonda et al., 2000]. Außerdem ist bekannt, dass alleine schon der mechanische Stress, der bei einer artefiziellen Infusion oder Perfusion zwangsläufig auf das Gefäß einwirkt, zu relevanten Schäden am Endothel der Pfortader führt [Horikawa et al., 1994].

Die Verwendung von TNF- α in einem Leberinfusions-Modell ist ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. 1990 zeigten Michael Kahky et al. Auswirkungen einer portalvenösen TNF- α -Injektion im Vergleich zur systemischen Gabe an Ratten. Sie applizierten das Medikament in einer Dosierung von $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ über 7 Tage. Die Tiere, welche diese Dosis systemisch erhielten, überlebten die gesamte Nachuntersuchungszeit, unter portalvenöser Gabe verstarben die Tiere jedoch nach etwa 3 Tagen. Die Mortalität resultierte vornehmlich aus Funktionsbeeinträchtigungen von Niere und Darmmukosa und nicht aus einer etwaigen Hepatotoxizität [Kahky et al., 1990].

Rong Yang et al. konnten in einem anderen Versuch an der Ratte zeigen, dass TNF- α in einer Dosierung von ca. $200\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ über die A. hepatica appliziert von den Tieren problemlos toleriert wird [Yang et al., 1995].

Die Arbeitsgruppe um Kenneth Wright und Giora Mavligit verabreichten Hunden TNF- α in ansteigender Dosierung ($0,02\text{mg}/\text{m}^2$; $0,2\text{mg}/\text{m}^2$ und $2\text{mg}/\text{m}^2$) über die Leberarterie.

Sie fanden heraus, dass lediglich die Gabe der Höchstdosis von $2\text{mg}/\text{m}^2$ relevante Nebenwirkungen und histopathologische Veränderungen nach sich zog. Bei niedrigdosierter TNF- α -Infusion fand sich keine Leberzellschädigung und sie wurde von den Versuchstieren gut vertragen.

In Zusammenschau all dieser Daten erscheint die Auswahl des in dieser Studie vorliegenden Modells, also eine HAI, die attraktivste Methode der Infusionswege darzustellen. Demnach könnte man über den arteriellen Schenkel - verglichen mit dem portalvenösen, bzw. peripheren Zugang - höhere Dosen bei geringerem Nebenwirkungsprofil und längerer lokaler Wirkzeit verabreichen.

7.1.4. Tumornekrosefaktor-alpha

Das für die Versuche verwendete Medikament BEROMUN[®] beinhaltet den Wirkstoff Tasonermin bzw. humanen Tumornekrosefaktor alfa-1a (TNF α -1a) mit einer Aktivität von $3.0\text{--}6.0 \times 10^7$ IU. Nach Angaben des Herstellers beruht dessen antitumoröse Wirkung auf verschiedenen direkten und indirekten Mechanismen: Dies sind die direkte Inhibition der Tumorzellproliferation, die man in vitro an unterschiedlichen Zelllinien nachweisen konnte, die direkte Wirkung auf die Tumervaskularisation, sowie eine direkte und indirekte Modulation des Immunsystems des jeweils behandelten Organismus in vivo [Boehringer Ingelheim International GmbH 2004].

Die einzelnen Wirkmechanismen und deren spezifische Effekte wurden in mehreren Studien verschiedener Arbeitsgruppen untersucht.

Havell et al. beschrieben zytotoxische Effekte an Tumorzellen sowie die Induktion hämorrhagischer Nekrose im Tumorzentrum und eine immunologische Komponente bei Mäusen [Havell et al., 1988]. Man stellte fest, dass diese Effekte T-Zell-abhängig waren, da man sie bei T-Zell-defizienten Mäusen nicht nachweisen konnte. Ähnliches zeigte eine andere Arbeit, bei der sich eine solche TNF-Wirkung nach radiogen induzierter Leukozytendepletion in Ratten nicht mehr nachweisen ließ [Manusama et al., 1998]. Hieraus lässt sich folgern, dass es sich eher um indirekte TNF-Einflüsse handelte, da diese abhängig vom Vorhandensein von Leukozyten waren. Gnant et al. fanden neben einer prokoagulatorischen Wirkkomponente, eine erhöhte Sekretion der Interleukine-6 und -8, der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 und des TF (tissue factor) [Gnant et al., 2000]. In Endothelzellen induziert TNF die Synthese von Endothelin-I (ET-I), einem potenten Vasokonstriktor, bei gleichzeitig erhöhtem Blutfluss und erniedrigter Acetylcholinsensibilität [Patel et al., 2002]. In vitro konnte man in einer jüngeren Arbeit außerdem eine Erhöhung von TIA-I feststellen. Hierbei handelt es sich um ein RNA-bindendes Translations-regulierendes Protein. Durch eine Erhöhung des selben

könnten Tumorendothelzellen für pro-apoptische Stimuli sensitiviert werden und somit NK-Zellen (Natürliche Killer-Zellen) zur Tumordestruktion anregen [Mocellin et al., 2003]. Ein anderer antitumoröser Wirkmechanismus wird in der Ausbildung von Thromben in den Tumorgefäßen gesehen [Shimomura et al., 1988]. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass TNF die Aktivität des Integrins $\alpha_v\beta_3$ reduziert. $\alpha_v\beta_3$ spielt eine Schlüsselrolle in der Tumorangio-genese. TNF hat also eine anti-vaskuläre Wirkkomponente [Ruegg et al., 1998]. Auch wird eine Mehrausschüttung von von Willebrand Faktor (VWF) in Zusammenhang mit TNF-Applikation gebracht. Als Konsequenz hieraus fände sich ebenfalls eine vermehrte Thrombogenität in der Strombahn von Tumorgefäßen mit Reduktion des Blutflusses, vergleichbar mit der Frühphase einer hämorrhagischen Infarzierung [Renard et al., 1995]. Andere Autoren hingegen messen der Eigenaktivität des TNF nicht so viel Bedeutung bei und sehen eine eher additive bzw. synergistische Wirkung in Kombination mit Zytostatika. So sei der wesentliche Antitumoreffekt von TNF die lokale Konzentration von Chemotherapeutika im Tumorgewebe zu erhöhen [van der Veen et al., 2000].

Letztlich sind es also vielfältige Mechanismen, die der antitumorösen Wirkung des Tumornekrosefaktors zugrunde liegen. Zusammenfassend findet sich in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Leukozyten eine Reduktion des Blutflusses, eine erhöhte Thrombogenität, multiple Auswirkungen auf verschiedenste Zytokine, Proteine und Moleküle, sowie eine erhöhte Apoptosesensitivität- und -aktivität, was schlussendlich zur Induktion einer Apoptose mit konsekutiver Tumornekrose führt.

7.1.5. Untersuchungsmethoden

Die Methode der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie ist vielfach vorbeschrieben und stellt ein allgemein akzeptiertes Verfahren zur Beurteilung der Mikrozirkulation dar.

Um die Mikrozirkulation bestimmter Gewebe analysieren zu können stehen verschiedene Techniken wie Laser-Doppler-Flowmetrie [Menger et al., 1992a], Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen [Kunz et al., 1991; Connor et al., 1992], polarographische Oxymetrie [Haruna et al., 1998; Mücke et al., 2000], Indikatorverdünnungsmethoden [Lapointe and Olsen, 1989], die Thermodilutionsmethode [Marx et al., 2006] und andere zur Verfügung. Da es sich bei diesen Untersuchungstechniken gänzlich um indirekte Methoden handelt, erlauben sie keine Visualisierung oder Quantifizierung individueller Mikrogefäße. Um die Mikrohämodynamik und deren detaillierte Abläufe über einen längeren Zeitraum qualitativ und quantitativ analysieren zu können, ist die intravitale Fluoreszenzmikroskopie als direkte Methode am besten geeignet [Menger and Lehr, 1993; Marzi et al., 1990; McCuskey and McCuskey, 1984]. Die Dimensionen der untersuchten Gewebe erlauben jedoch nicht mehr die Anwendung von Durchlichttechnik, sondern machen vielmehr eine

Mikroskopie in Auflichttechnik erforderlich. Mit Hilfe dieser Technik gelingt es die kapillaren Netzwerke des Leber- und Tumorgewebes zu visualisieren. Die Messung mikrovaskulärer Gefäßdurchmesser, der Erythrozytenfließgeschwindigkeit und der adhärennten Leukozyten erfordert allerdings hochauflösende Objektive, die die Fokustiefe auf die äußeren Gewebeschichten begrenzen. Somit ermöglicht die intravitale Fluoreszenzmikroskopie lediglich die Darstellung derjenigen Gefäße, die oberflächlich liegen und horizontal zur optischen Achse verlaufen. Trotz dieser Einschränkung ermöglicht das vorliegende Modell eine präzise, selektive und quantitative Analyse der hepato-kapillaren Zirkulationsverhältnisse zu gleichen Untersuchungszeitpunkten und Untersuchungsbedingungen.

Da das Lebergewebe eine nur geringe Autofluoreszenz aufweist ist die Verwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen zur Verbesserung des Bildkontrastes erforderlich [Gumucio et al., 1981; Sherman and Fisher, 1986; Vollmar et al., 1996]. Zur Darstellung der Perfusion wurden zu Versuchsbeginn Natrium-Fluoreszein ($2\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht, i.v.) und Rhodamin-6G ($0,1\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht, i.v.) appliziert. Die Kombination dieser beiden Farbstoffe in den genannten Konzentrationen erzeugte eine optimale Kontrastverstärkung für die intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen.

Potentiell ist die Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch die Verwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen wie Rhodamin-6G denkbar [Bereiter-Hahn et al., 1983; Higuti et al., 1980; Dietzmann et al., 1987]; in der gewählten Dosis ist jedoch eine Störung der Atmungskette, und somit eine Auswirkung auf die Ergebnisse aufgrund pharmakologisch-toxischer Eigenschaften des Farbstoffes unwahrscheinlich [Koyano et al., 1993]. Des weiteren kann eine längere Lichtexposition während der Intravitalmikroskopie intrazelluläre photodynamische Prozesse induzieren [Celi et al., 2003; Otterdal et al., 2006; Sorg et al., 2006], weshalb die Belichtung eines Gesichtsfeldes auf maximal 50 Sekunden und die Gesamtdauer der Mikroskopie pro Gewebe und Mikroskopiezeitpunkt auf 5 - 7 Minuten beschränkt wurde [Menger et al., 1993]. Die Auswahl der einzelnen Gesichtsfelder erfolgte randomisiert und es wurde explizit darauf geachtet, nicht in unmittelbarer Nähe eines bereits belichteten Areal wiederholt zu mikroskopieren.

Durch die Minimierung der Belichtungszeit und die Vielzahl der intravitalmikroskopisch erfassten Parameter konnte eine Echtzeit-Analyse der Mikro-zirkulation nicht durchgeführt werden, so dass eine Dokumentation der mikroskopischen Bilder mit Hilfe einer hochauflösenden CCD-Kamera [Hiraoka et al., 1987] und einer Videoaufzeichnungseinheit [Stock et al., 1989] unerlässlich ist. Denn dies macht eine Quantifizierung der einzelnen Parameter nach Abschluss der einzelnen Experimente

durch einmalige oder auch wiederholte Analyse der einzelnen Bildsequenzen möglich [Menger et al., 1993; Langer et al., 2002; Virgini-Magalhaes et al., 2006].

7.2. Diskussion der Ergebnisse

7.2.1. Isolierte hepatische Perfusion

Das wesentliche Merkmal der IHP mit TNF- α in der vorliegenden Versuchsreihe, ist die selektive Beeinträchtigung der hepatischen Mikrozirkulation. Dieser Effekt entsteht sowohl durch die Verlangsamung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit, als auch durch die direkte Induktion eines kapillaren Perfusionsversagens in den Gefäßen der Lebermetastasen. Dabei müssen diese beiden Haupteffekte nicht streng getrennt betrachtet werden, sondern vielmehr als sich einander ergänzend oder bedingend. Dazu belegen die hier gezeigten Daten einen eindrucksvollen Anstieg von adhärenenten Leukozyten in der Mikrozirkulation des Tumors, wohingegen die übrige Leber keinen oder lediglich einen moderaten Anstieg im Sinne einer Entzündungsreaktion zeigt.

Interessanterweise fand sich durch die selektive Störung der Tumormikrozirkulation bei gleichzeitiger leukozytärer Inflammation eine vermehrte Apoptose im Tumor.

In Studien zur isolierten Extremitätenperfusion (isolated limb perfusion, ILP) konnte gezeigt werden, dass TNF- α eine Endothelaktivierung und -schädigung einhergehend mit erhöhter Thrombozytenaggregation induzieren kann [Renard et al., 1994; Renard et al., 1995]. Man ging davon aus, dass dies letztlich zu einer Störung der Mikrohämodynamik führt. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Aktivierung des Gefäßendothels in Form von Erythrozyten- und Leukozyten-Endothelinteraktion verzeichnet werden. Außerdem fand sich eine gering erhöhte Bildung von Fibrin unter der Wirkung von TNF- α und auch vereinzelte Thrombenbildung. In der frühen Phase nach TNF- α -Applikation, wie sie im Akutversuch untersucht wurde, sind dies die wesentlichen Mechanismen der BEROMUN[®]-Wirkung.

Die detaillierte Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zeigt vor allem in den Tumorkapillaren einen massiven Anstieg weißer Blutkörperchen und zwar unabhängig davon, ob TNF appliziert wurde oder nicht. Interessant ist dieser Leukozytenanstieg in den Tumorgefäßen vor dem Hintergrund, das Tumoren an sich eine geringere Tendenz zu leukozytären Reaktionen verglichen mit dem normalen Lebergewebe haben [Dirkx et al., 2003]. In der vorliegenden Arbeit fand sich jedoch eine deutliche inflammatorische Reaktion im Sinne eines vermehrten Anhaftens der Leukozyten am Endothel der Tumorgefäße wenn

eine IHP mit oder auch ohne TNF durchgeführt wurde. Somit hat schon allein der Prozess der IHP eine antitumoröse Wirkung [van Ijken et al., 2000b].

Wie bereits mehrfach erwähnt, werden dem TNF noch eine Vielzahl weiterer Wirkmechanismen zugeschrieben. So konnten Renard et al. eine durch TNF provozierte Schwellung der Endothelzellen mit konsekutiver Zellkern-Protrusion im mikrovaskulären Lumen aufzeigen. Die hierdurch bedingte Lumeneinengung verursacht eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes mit sekundärer Verlangsamung der Strömungsgeschwindigkeit des Blutflusses. Mit Hilfe eines Elektronenmikroskopes konnte nachgewiesen werden, dass dies auf die Tumorgefäße beschränkt war. Die Lumina der angrenzenden Lebergefäße zeigten keine derartigen Veränderungen [Renard et al., 1994]. Die Ergebnisse von Renard könnten die - auch in der vorliegenden Studie gefundene - Tumorselektivität von TNF erklären. Zusätzlich zur Lumeneinengung durch Zellschwellung resultiert eine Zunahme adhärenter Leukozyten ebenfalls in einer Verminderung des Durchmessers der Gefäßstrombahn, was zu erhöhtem Gefäßwiderstand führt [Korthuis et al., 1988; Menger et al., 1992b]. Eine solche Steigerung der Leukozytenadhärenz als Ausdruck einer vermehrten Immunreaktion des Organismus konnte bei der IHP mit TNF- α gefunden werden.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Wirkung von TNF könnte in der Erhöhung der Gefäßpermeabilität zu sehen sein. In verschiedenen Arbeiten wurde diese Wirkung, die letztlich eine Leckage des intraluminalen Volumens mit Anreicherung im Gewebe nach sich zieht, gezeigt werden [de Wilt et al., 2000; Van der Veen et al., 2000]. Aus der Permeabilitätssteigerung resultiert neben einer Erhöhung des TNF im Tumorgewebe auch die Ausbildung eines Ödems in der Umgebung [Renard et al., 1994]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der interstitielle Druck in dem ödematösen Tumorgewebe ansteigt, zumal Tumoren über ein nur wenig ausgeprägtes lymphatisches Abflusssystem verfügen [Padera et al., 2002] und dementsprechend überflüssiges Sekret nicht ausreichend abtransportieren können. Diese interstitielle Druckerhöhung bewirkt eine weitere Einengung der Tumorgefäße, was ebenfalls zum kapillaren Perfusionsversagen beiträgt [Jerome et al., 1993].

In den TNF- α -behandelten Tieren der IHP-Reihe fand sich ein geringer Anstieg des Ratten-spezifischen TNF und eine massive Erhöhung des IL-6 im Serum. Vergleichbare Daten sind aus klinischen Studien bekannt. Die Mitarbeiter um De Vries und Lans fanden in der ersten Stunde nach einer TNF-IHP bei Patienten mit Lebertumoren ebenfalls erhöhte IL-6 Konzentrationen. Bei den Untersuchungen der hier diskutierten Studie konnte zusätzlich ein Abfall des anti-inflammatorischen IL-10 verzeichnet werden. In diesem Zusammenhang lässt sich vermuten, dass humanes TNF- α in einem IHP-Setting nicht nur eine proinflammatorische Zytokinantwort über TNF induziert, sondern zusätzlich anti-inflammatorische Zytokine, wie

IL-10 zu supprimieren vermag, obwohl IL-10 hauptsächlich über IL-6 reguliert wird. Interessant war auch, dass der IL-8-Serumspiegel sowohl in der TNF- als auch in der NaCl-Kontrollgruppe erhöht war, was eine Folge des Operationstraumas darstellen könnte.

Die Untersuchung und Quantifizierung Caspase-3-positiver Zellen nach IHP zeigte eine durch TNF- α vermittelten Anstieg apoptotischer Zellen im Tumorgewebe. Es ist hinreichend bekannt, dass Hypoxämie einer der wichtigsten Trigger für Apoptose darstellt [Lopez-Neblina et al., 2005]. Eben solche hypoxische Bedingungen werden im Rahmen einer isolierten Leberperfusion mit TNF- α durch den Zusammenbruch der Tumor-Mikrozirkulation geschaffen. Demnach könnte der durch TNF- α entstandene Perfusionschaden eine Hauptursache für eine Hypoxämie mit konsekutivem Zelluntergang durch Apoptose spezifisch im Tumor sein. Die Zusammenschau der IHP-Ergebnisse der vorliegenden Studie konnte also zeigen, dass das TNF- α -induzierte Perfusionsversagen überwiegend die Mikrozirkulation des Tumors betraf und eben nicht das umgebende Lebergewebe. Dies erklärt sich zum einen durch die selektive Wirkung des TNF [Renard et al., 1994; van Etten et al., 2003] als auch durch die überwiegend arterielle Perfusion des Tumors [Ackerman et al., 1969; Breedis and Young, 1954]. Auf die Mechanismen der Blutversorgung der Leber und ihrer Malignome bzw. Metastasen, sowie der direkten und indirekten TNF-Wirkungen wurde in den vorigen Abschnitten bereits ausführlich eingegangen, weshalb auf eine erneute Darstellung an dieser Stelle verzichtet wird.

7.2.2. Hepato-arterielle Infusion

Äquivalent den Ergebnissen der Untersuchungen zur isolierten hepatischen Perfusion, fand sich auch bei der hepato-arteriellen Infusion mit TNF- α eine selektive Störung der Tumormikrozirkulation. Diese war wiederum durch Perfusionsversagen, Herabsetzung der Blutströmungsgeschwindigkeit und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion charakterisiert. Im Vergleich der beiden Dosierungen (15 μ g/kg KG und 30 μ g/kg KG) konnte keine ausgeprägte Dosis-Wirkungsbeziehung festgestellt werden. Es zeigte sich, dass auch die niedrigere Dosis einen deutlichen Effekt hatte. Interessanterweise war die Leukozytenantwort in der niedrig dosierten Gruppe sogar stärker ausgeprägt. Die dem Tumor benachbarten Leberstrukturen blieben erneut relativ unbeeinflusst von der TNF- α -Behandlung. Schließlich mündeten die durch TNF- α -Applikation induzierten Veränderungen in der kapillaren Strombahn, wie schon bei der IHP beobachtet, in einer erhöhten Apoptoserate der Tumorzellen. Das Modell der TNF- α -HAI ist also, bei vergleichbaren Ergebnissen, tatsächlich eine Vereinfachung des IHP-Modells. Offen bleibt jedoch die Frage nach der idealen Dosierung des Medikaments in einem solchen Ansatz.

Im Hinblick auf eben diesen Gesichtspunkt untersuchten de Wilt und Mitarbeiter bei der isolierten Extremitätenperfusion im Rattenmodell die niedrigste mögliche TNF- α -Dosierung mit der noch eine Wirkung in Kombination mit Melphalan zu verzeichnen war. Die Autoren stellten fest, dass unterhalb einer Dosis von 40 μ g/kg keine antitumorösen Wirkungen in Verbindung mit Melphalan nachzuweisen sind [de Wilt et al., 1999]. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass eine low-dose TNF- α -Gabe sogar einen proliferativen Stimulus für die Angiogenese darstellen kann, wohingegen hohe Dosen destruktiv auf neu gebildete Blutgefäße wirken [Fajardo et al., 1992].

In der hier vorgestellten Arbeit gelang es jedoch bei einer HAI mit Dosierungen von 15 μ g/kg KG und 30 μ g/kg KG TNF- α eine deutliche Endothelalteration im Sinne einer Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und daraus resultierenden Perfusionsausfall, selbst mit der niedrigeren Dosierung zu erzielen. Einen Erklärungsansatz für diese widersprüchlichen Resultate bietet wiederum die Tatsache, dass mit dem arteriellen Zufluss, wie er in einem HAI-Setting gegeben ist, der Lebertumor selektiv erreicht wird, da dieser seine Blutversorgung spezifisch aus der Arterie erhält, während die restliche Leber vorwiegend über die Pfortader versorgt wird, und somit nicht direkt in die Infusion involviert ist.

Vergleicht man in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse der rh-TNF- α -Konzentration nach 15 und 180min zwischen dem IHP- und HAI-Modell findet man, wie zu erwarten, zu beiden Zeitpunkten eine höhere Konzentration des Zytokins, wenn es einmalig infundiert wurde. Das erklärt sich notwendigerweise dadurch, dass das TNF bei der HAI nach Applikation im systemischen Kreislauf der Versuchstiere verbleibt. Ebenso gibt es im HAI-Setting im Gegensatz zur isolierten Perfusion keine Wash-out-Verfahren. Bei der IHP besteht durch das Wash-out die Möglichkeit, dass nicht nur freies, ungebundenes TNF, sondern auch rezeptorgebundenes TNF und andere Zytokine mit ausgespült werden. Demnach lässt die HAI zwar nicht so hohe Dosierungen wie die IHP zu, jedoch gestattet dieses Modell eine insgesamt längere Wirkdauer. Da die systemischen TNF- α -Spiegel 15min nach HAI nur etwa 30ng/ml betragen, lässt sich festhalten, dass in dieser Zeitspanne nur etwa 10 bis 20% des Medikaments die Leber passiert hat. Der größte Teil des TNF könnte zu diesem Zeitpunkt somit intraheptisch, am ehesten rezeptorgebunden, zu finden sein.

Wie oben erwähnt spielen die Leukozyten eine bedeutende Rolle für die Wirksamkeit des TNF- α . Dies gilt sowohl für die isolierte Perfusion als auch für die hepatoarterielle Infusion der Leber. Bei der HAI war ein Anstieg der Leukozyten-Endothel-Interaktion schon unmittelbar nach der Infusion zu verzeichnen. Über den Zeitraum von 180min nahm die Aktivität sogar noch gering zu. In den Tumorgefäßen war die Anzahl adhärenter Leukozyten bei der HAI wesentlich höher verglichen mit der IHP. Diese Beobachtung lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass die HAI im Unterschied zur IHP

keine Blockierung des hepatischen Blutflusses zur Folge hat. Demnach stehen den Leber- und Tumorgefäßen eine wesentlich höhere Anzahl an korpuskulären Blutbestandteilen zur Verfügung. Gleiches gilt für den bereits diskutierten Wash-out nach isolierter hepatischer Perfusion. Hier werden wahrscheinlich weiße Blutkörperchen im Rahmen des Spülvorganges aus der Zirkulation entfernt.

In der vorliegenden Untersuchung wurde von niedrigeren TNF- α -Dosierung eine höhere Anzahl adhärenter Leukozyten in den Tumorgefäßen induziert. Dies kann dahingehend diskutiert werden, dass die Immunantwort durch die leukozytäre Reaktion besser durch eine adäquate Dosierung im unteren Bereich gewährleistet werden kann, während eine Hochdosisgabe eher eine Blockade der Leukozytenaktivierung bewirkt.

Der Perfusionsausfall war allerdings in der höher dosierten Gruppe stärker ausgeprägt. Die Tatsache, dass die TNF- α -Dosis von 15 μ g/kg KG einen geringeren Perfusionschaden trotz einem deutlicheren Anstieg der weißen Blutkörperchen verursacht, weist darauf hin, dass es zwei unterschiedliche Mechanismen bzw. Kaskaden für diese beiden Wirkungen geben könnte. Interessanterweise war das Mikrozirkulationsversagen in der 30 μ g/kg-Gruppe vergleichbar dem der IHP.

Die Zytokinantwort fiel in der HAI verglichen mit der IHP inkongruent aus. Zwar fand sich auch bei hepato-arterieller Infusion unter der Wirkung von TNF- α ein massiver Anstieg von Interleukin-6, bei konsekutiv erhöhter IL-10-Konzentration jedoch eine Verminderung von IL-8. Die Applikationsart des TNF sowie dessen Dosierung könnten also einen Einfluss auf die Zytokinantwort zu haben. Diese Diskrepanz zu den Ergebnissen der IHP ist in der Zusammenschau positiv zu bewerten, da sie eine Minderung der systemischen Entzündungsreaktion für die Tiere bedeutet.

Die Analyse der Caspase-3-Expression zeigte auch nach HAI eine selektiv und spezifisch im Tumor erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen. Diese war in beiden Dosierungen vergleichbar zu beobachten und lässt sich auch hier auf den entstandenen Perfusionschaden mit Induktion einer Gewebhypoxie zurückführen.

7.3. Schlussfolgerung

Unabhängig von der verwendeten Spezies ist der prinzipielle Nachteil aller Tierversuche die nur bedingt mögliche Übertragbarkeit von tierexperimentell gewonnenen Ergebnissen auf den Menschen. Unerwünschte teils deletäre Nebeneffekte einer TNF- α -Applikation beim Menschen sind hinlänglich bekannt [Azémar et al., 2000]. In der vorliegenden Studie wurde die TNF- α -Gabe von den Tieren in der Akutphase gut toleriert.

Allerdings ist durch eine Arbeit von Brouckaert et al. (1992) darauf hingewiesen worden, dass das rh-TNF in Mäusen nur an den murinen Rezeptor p55 bindet und nicht an den p75-Rezeptor. Hierunter hat TNF eine rund 5-10mal geringere Aktivität und Toxizität [Brouckaert et al., 1992]. Ähnliches könnte auch für WAG-Ratten gelten. Jedoch ist der vielversprechende Nutzen dieses Medikaments sowohl in tierexperimentellen als auch klinischen Studien ebenfalls vielfach beschrieben worden. Nicht zuletzt zeigt auch die vorliegende Arbeit Hinweise auf einen therapeutischen Nutzen des rekombinanten humanen Tumornekrosefaktor alpha.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Applikation von rh-TNF- α 1a in einer isolierten hepatischen Perfusion oder hepato-arteriellen Infusion zu einer selektiven Zerstörung der Tumormikrozirkulation in Lebermetastasen eines Kolonkarzinoms ohne wesentliche Beeinträchtigung der hepatischen Perfusionverhältnisse führt. Dieser Mechanismus ist im wesentlichen auf die Aktivierung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, mit Herabsetzung der kapillaren Blutströmungsgeschwindigkeit und einer proinflammatorischen Immunreaktion des Organismus zurückzuführen. Schlussendliches Äquivalent dieser Reaktion ist die Induktion einer Gewebehypoxie mit vermehrter Apoptose in den Tumorzellen. Diese komplexe Kaskade der mikrovaskulären Dysfunktion kann als Schlüsselmechanismus in der Akutphase der TNF- α -Wirkung auf Tumorgewebe betrachtet werden. Die HAI von TNF- α stellt hierbei ein sicheres Operationsverfahren mit gutem Effekt und vertretbaren systemischen Nebenwirkungen dar.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A./Aa.	-	Arteria/Arteriae
ALAT	-	Alaninaminotransferase
ASAT	-	Aspartataminotransferase
BE	-	Base Excess (Basenüberschuß)
BGA	-	Blutgasanalyse
bzw.	-	beziehungsweise
CAE	-	AS-D Chloracetatesterase
CAM	-	Cell adhesion molecule
°C	-	Grad Celsius
cm	-	Zentimeter
CO ₂	-	Kohlendioxid
Δ (delta)	-	Differenz
d.h.	-	das heißt
ET	-	Endothelin
FAP	-	Familiäre Adenomatosis Polyposis Coli
5-FU	-	5-Fluorouracil
LDH	-	Laktatdehydrogenase
HAI	-	Hepatoarterielle Infusion / Hepatic arterial infusion
Hb	-	Hämoglobin
HE	-	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	-	Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
HPF	-	High Power Field
i.d.R.	-	in der Regel
IHP	-	Isolierte hepatische Perfusion / isolated hepatic perfusion
IHHP	-	isolated hypoxic hepatic perfusion

ILP	-	isolated limb perfusion
IU	-	International Units
IL-6/-8/-10	-	Interleukin-6/-8/-10
i.p.	-	intraperitoneal
i.v.	-	intravenös
kg	-	Kilogramm
KG	-	Körpergewicht
LITT	-	Laserinduzierte Thermotheapie
max.	-	maximal
mg	-	Milligramm
MG	-	Molekulargewicht
µg	-	Mikrogramm
min	-	Minute
ml	-	Milliliter
mm	-	Millimeter
MMC	-	Mitomycin C
MW	-	Mittelwert
n	-	Anzahl
NaCl	-	Natrium-Chlorid
NK-Zellen	-	Natürliche Killerzellen
O ₂	-	Sauerstoff
P _a CO ₂	-	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PIHP	-	Percutaneous Isolated Hepatic Perfusion
pH	-	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
P _a O ₂	-	arterieller Sauerstoffpartialdruck
RFA	-	Radiofrequenzablation
SD	-	standard deviation (Standardabweichung)
SEM	-	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TACE	-	TNF alpha converting enzyme
TF	-	Tissue Factor
TNF	-	Tumornekrosefaktor
U/min	-	Umdrehungen pro Minute
vs.	-	versus (gegenüber)
z.B.	-	zum Beispiel
z.T.	-	zum Teil

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ackerman N, Lien W, Kondi E, Silverman N (1969) The blood supply of experimental liver metastases. I. The distribution of hepatic artery and portal vein blood to "small" and "large" tumors. *Surgery* 66: 1067-1072
2. Adam R, Avisar E, Ariche A (2001) Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol* 8: 347-353
3. Advanced colorectal cancer Meta-Analysis project (1992) Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: Evidence in terms of response rate. *J Clin Oncol* 10: 896-903
4. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN (1985) Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* 260: 2345-2354
5. Aigner K, Walther H, Tonn JC, Krahl M, Wenzl A, Merker G, Schwemmler K (1982) Isolated liver perfusion with 5-fluorouracil (5-FU) in the human. *Chirurg* 53: 571-573
6. Albrecht D, Germer C, Isbert C, Buhr HJ (1996) Laser-induced thermotherapy for palliative treatment of malignant liver tumors: results of a clinical study. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 113: 136-138
7. Alexander HR, Bartlett DL, Libutti SK, Fraker DL, Moser T, Rosenberg SA (1998) Isolated hepatic perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for unresectable cancers confined to the liver. *J Clin Oncol* 16: 1479-1489
8. Alexander HR, Libutti SK, Bartlett DL, Puhmann M, Fraker DL, Bachenheimer LC (2000 a) A phase I-II study of isolated hepatic perfusion using melphalan with or without tumor necrosis factor for patients with ocular melanoma metastatic to liver. *Clin Cancer Res* 6: 3062-3070
9. Alexander HR, Bartlett DL, Libutti SK (2000 b) Current status of isolated hepatic perfusion with or without tumor necrosis factor for the treatment of unresectable cancers confined to liver. *Oncologist* 5: 416-424
10. Alexander HR, Libutti SK, Bartlett DL, Pingpank JF, Kranda K, Helsabeck C, Beresnev T (2002) Hepatic vascular isolation and perfusion for patients with progressive unresectable liver metastases from colorectal carcinoma refractory to previous systemic and regional chemotherapy. *Cancer* 95: 730-736

11. Alexander HR, Libutti SK, Pingpank JF, Bartlett DL, Helsabeck C, Beresneva T (2005) Isolated hepatic perfusion for the treatment of patients with colorectal cancer liver metastases after irinotecan-based therapy. *Ann Surg Oncol* 12: 138-144
12. Ausmann RK (1961) The development of a technique for isolated perfusion of the liver. *Surg Forum* 10: 77-79
13. Azémar M, Dengler W, Unger C (2000) Tasonermin - Eine Option für fortgeschrittene nicht operable Weichteilsarkome der Extremitäten. *Arzneimitteltherapie* 18: 203-206
14. Babbs C, Salaris S, Turek J (1991) Cytochemical studies of hydrogen peroxide generation in postischemic hepatocytes. *Am J Physiol* 260: H123-H129
15. Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA (1994) Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-Selectin on the rolling cells. *J Exp Med* 180: 1785-1792
16. Bazzoni F, Beutler B (1996) The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334: 1717-1725
17. Bereiter-Hahn J, Seipel K-H, Vöth M, Ploem J (1983) Fluorimetry of mitochondrial in cells vitally stained with DASPMI or rhodamine 6GO. *Cell Biochem Funct* 1: 147-155
18. Beutler B, Cerami A (1986) Cachectin/tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation. *Immunol Res* 5: 281-293
19. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A (1985) Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316: 552-554
20. Birth M, Hildebrand P, Dahmen G, Ziegler A, Bröring DC, Hillert C, Bruch HP (2005) Present state of radio frequency ablation of liver tumors in Germany. *Chirurg* 75: 417-423
21. Bickels J, Manusama ER, Gutman M, Eggermont AM, Kollender Y, Abu Abid S, Van Geel AN, Lev Shlush D, Klausner JM, Meller I (1999) Isolated limb perfusion with tumour necrosis factor-alpha and melphalan for unresectable bone sarcomas of the lower extremity. *Eur J Surg Oncol* 25: 509-514
22. Boehringer Ingelheim International GmbH (2004) Beromun - Summary of Product Characteristics (SPC)
23. Borel Rinkes IH, de Vries MR, Jonker AM, Swaak TJ, Hack CE, Nooyen PT, Wiggers T, Eggermont AM (1997) Isolated hepatic perfusion in the pig with TNF-alpha with and without melphalan. *Br J Cancer* 75: 1447-1453
24. Breedis C, Young C (1954) The blood supply of neoplasms in the liver. *Am J Pathol* 30: 969-985

25. Brouckaert P, Libert C, Everaerd B, Fiers W (1992) Selective species specificity of tumor necrosis factor for toxicity in the mouse. *Lymphokine Cytokine Res* 11: 193-196
26. Burkel WE (1969) The fine Structure of the terminal branches of the hepatic arterial system of the rat. *Anat Rec* 167: 329-349
27. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferraresso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P (1997) The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* 183: 477-485
28. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 3666-3670
29. Celi A, Merrill-Skoloff G, Gross P, Falati S, Sim D, Flaumenhaft R, Furie B, Furie B (2003) Thrombus formation: direct real-time observation and digital analysis of thrombus assembly in a living mouse by confocal and widefield intravital microscopy. *J Thromb Haemost* 1: 60-68
30. Cohen AD, Kemeny NE (2003) An update on hepatic arterial infusion chemotherapy for colorectal cancer. *Oncologist* 8: 553-566
31. Coley WB (1893) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 105: 487-511
32. Connor HD, Wenshi G, Nukina S, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG (1992) Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat - an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation* 54: 199-204
33. Creech O, Jr., Kremenz ET, Ryan RF, Winblad JN (1958) Chemotherapy of cancer: regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit. *Ann Surg* 148: 616-632
34. de Brauw LM, Van de Velde CJ, Tjaden UR (1988) In vivo isolated liver perfusion technique in a rat hepatic metastasis model: 5-fluorouracil concentrations in tumor tissue. *J Surg Res* 44: 137-145
35. de Vries MR, Rinkes IH, van de Velde CJ, Wiggers T, Tollenaar RA, Kuppen PJ, Vahrmeijer AL, Eggermont AM (1998) Isolated hepatic perfusion with tumor necrosis factor alpha and melphalan: experimental studies in pigs and phase I data from humans. *Recent Results Cancer Res* 147: 107-119
36. de Vries MR, ten Hagen TL, Marinelli AW, Eggermont AM (2003) Tumor necrosis factor and isolated hepatic perfusion: from preclinical tumor models to clinical studies. *Anticancer Res* 23: 1811-1823
37. de Wilt JH, Manusama ER, van Tiel ST, van Ijken MG, ten Hagen TL, Eggermont AM (1999) Prerequisites for effective isolated limb perfusion using tumour necrosis factor alpha and melphalan in rats. *Br J Cancer* 80: 161-166

38. de Wilt JH, ten Hagen TL, de BG, van Tiel ST, de Bruijn EA, Eggermont AM (2000) Tumour necrosis factor alpha increases melphalan concentration in tumour tissue after isolated limb perfusion. *Br J Cancer* 82: 1000-1003
39. Dietzmann K, Letko G, Sokolowski A (1987) Mitochondrial membrane potential in living cells: evidence from studies with rhodamine6G as fluorescent probe. *Exp Pathol* 31: 47-51
40. Dirkx A, Oude Egbrink M, Kuijpers M, van der Niet S, Heijnen V, Boumater Steege J, Wagstaff J, Griffioen A (2003) Tumor angiogenesis modulates leukocyte-vessel wall interactions in vivo by reducing endothelial adhesion molecule expression. *Cancer Res.* 2003;63:2322-2329.
41. Doci R, Bignami P, Quagliuolo V (1990) Continuous hepatic arterial infusion with 5-fluorodeoxyuridine for treatment of colorectal metastases. *Reg Cancer Treat* 3: 13-18
42. Douillard JY, Sobrero A, Carnaghi C, Comella P, az-Rubio E, Santoro A, Van CE (2003) Metastatic colorectal cancer: integrating irinotecan into combination and sequential chemotherapy. *Ann Oncol* 14 Suppl 2: ii7-12
43. Ensminger WD (2002) Intrahepatic arterial infusion of chemotherapy. *Semin Oncol* 29: 119-125
44. Eggermont AM, Schraffordt Koops H, Klausner JM, Kroon BB, Schlag PM, Lienard D, Van Geel AN, Hoekstra HJ, Meller I, Nieweg OE, Kettelhack C, Ben Ari G, Pector JC, Lejeune FJ (1996) Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas. The cumulative multicenter European experience. *Ann Surg* 224: 756-764
45. Fajardo L, Kwan H, Kowalski J, Prionas S, Allison A (1992) Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol* 140: 539-544
46. Ferguson D, McDonagh PF, Biewer J, Paidas CN, Clemens MG (1993) Spatial relationship between leucyte accumulation and microvascular injury during reperfusion following hepatic ischemia. *Int J Microcirc Clin Exp* 12: 45-60
47. Fliieger D, Keller R, Fischbach W (2004) Palliative treatment for colorectal cancer. *Internist* 45: 786-794
48. Fong Y, Fortner J, Sun RL (1999) Clinical Score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 230: 309-318
49. Germer CT, Buhr HJ, Isbert C (2005) [Nonoperative ablation for liver metastases. Possibilities and limitations as a curative treatment]. *Chirurg* 76: 552-563
50. Gnant MF, Turner EM, Alexander HR, Jr. (2000) Effects of hyperthermia and tumour necrosis factor on inflammatory cytokine secretion and procoagulant activity in endothelial cells. *Cytokine* 12: 339-347

51. Gonda T, Ishida H, Yoshinaga K, Sugihara K (2000) Microvasculature of Small Liver Metastases in Rats. *J Surg Res* 94: 43-48
52. Gumucio J, Miller D, Krauss M, Zanolli C (1981) Transport of fluorescent compounds into hepatocytes and the resultant zonal labeling of the hepatic acinus in the rat. *Gastroenterology* 80: 639-646
53. Grünhagen DJ, de Wilt JHW, Graveland WJ, Verhoef C, van Geel AN, Alexander MM, Eggermont M.D. (2006a) Outcome and Prognostic Factor analysis of 217 Consecutive Isolated Limb Perfusions with Tumour Necrosis Factor- and Melphalan for Limb-threatening Soft Tissue Sarcoma. *Cancer* 106: 1776-84
54. Grünhagen DJ, de Wilt JHW, van Geel AN, Alexander MM, Eggermont M.D. (2006b) Isolated Limb Perfusion for Melanoma Patients: a review of its indications and the role of Tumor Necrosis Factor- α . *Eur J Surg Oncol* 32 (4): 371-80
55. Hafstrom LR, Holmberg SB, Naredi PL, Lindner PG, Bengtsson A, Tidebrant G, Schersten TS (1994) Isolated hyperthermic liver perfusion with chemotherapy for liver malignancy. *Surg Oncol* 3: 103-108
56. Harmantas A, Rotstein L, Langer B (1998) Regional versus systemic chemotherapy in the treatment of colorectal carcinoma metastatic to the liver: is there a survival difference? Meta-analysis of the published literature. *Cancer* 78: 1639-1645
57. Harris AG, Skalak TC (1993) Effects of leukocyte activation on capillary hemodynamics in skeletal muscle. *Am J Physiol* 264: H909-H916
58. Haruna M, Kumon K, Yahagi N, Watanabe Y, Ishida Y, Kobayashi N, Aoyagi T (1998) Blood volume measurement at the bedside using ICG pulse spectrophotometry. *Anaesthesiology* 89: 1322-1328
59. Hashimoto S, Itoh K, Nishida K, Okano T, Miyazawa Y, Okinaga K (1994) Rapid superoxide production by endothelial cells and their injury upon reperfusion. *J Surg Res* 57: 693-697
60. Havas HF, Groesbeck ME, Donnelly AJ (1958) Mixed bacterial toxins in the treatment of tumors. I. Methods of preparation and effects on normal and sarcoma 37-bearing mice. *Cancer Res* 18: 141-148
61. Havell EA, Fiers W, North RJ (1988) The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *J Exp Med* 167: 1067-1085
62. Healey JE, Smith JL, Clark RL (1961) Hepatic tissue tolerance to Thio-TEPA administered by the isolation-perfusion technique. *Ann Surg* 148: 111-116
63. Hendriks JM, Van Schil PE (1998) Isolated lung perfusion for the treatment of pulmonary metastases. *Surg Oncol* 7: 59-63

64. Higuti T, Niimi S, Saito R, Nakasima S, Ohe T, Tani I, Yoshimura T (1980) Rhodamine-6G, inhibitor of both H⁺-ejections from mitochondria energized with ATP and with respiratory substrates. *Biochim Biophys Acta* 593: 463-467
65. Hiraoka Y, Sedat J, Agard D (1987) The use of a charge-coupled device for quantitative optical microscopy of biological structures. *Science* 238: 36-41
66. Horikawa M, Nakajima Y, Kido K (1994) Simple method of hyperthermo-chemo-hypoxic isolated liver perfusion for hepatic metastases. *World J Surg* 18: 845-851
67. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84: 299-308
68. Ijzermans JN, Scheringa M, van der Schelling GP, Geerling RA, Marquet RL, Jeekel J (1992) Injection of recombinant tumor necrosis factor directly into liver metastases: an experimental and clinical approach. *Clin Exp Metastasis* 10: 91-97
69. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ (1992) Superoxide generation by neutrophil and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol* 52: 377-382
70. Jamison RL, Donohue JH, Nagorney DM (1997) Hepatic resection for metastatic colorectal cancer results in cure for some patients. *Arch Surg* 132: 505-510
71. Jerome S, Smith C, Korthuis R (1993) CD18-dependent adherence reactions play an important role in the development of the no-reflow phenomenon. *Am J Physiol* 264: H479-H483
72. Kahky MP, Daniel CO, Cruz AB (1990) Portal infusion of tumor necrosis factor increases mortality in rats. *J Surg Res* 49: 138-145
73. Kelly H, Goldberg RM (2005) Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J Clin Oncol* 23: 4553-4560
74. Kinoshita H (1968) A study on selective hepatic perfusion of an antitumor agent as a regional chemotherapy for advanced malignancies in the liver. *J Osaka City Med Center* 17: 19-51
75. Kollmar O, Schilling MK, Menger MD (2004) Experimental liver metastasis: standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin Exp Metastasis* 21: 453-460
76. Konno H, Lowe PJ, Hardison WG, Miyai K, Nakamura S, Baba S (1992) Breakdown of hepatic tight junctions during reoxygenation injury. *Transplantation* 53: 1211-1214
77. Konopke R, Saeger HG (2003) Lebermetastasen. *Diagnostik und Therapie. Chirurg* 74: 866-884

78. Korthuis R, Grisham M, Granger D (1988) Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 254: H823-H827
79. Koyano S, Araie M, Eguchi S (1993) Movement of fluorescein and its glucuronide across retinal pigment epithelium-choroid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 531-538
80. Kunz R, Brune HA, Ziegler U, Marzinzig M, Beger HG (1991) Ischämie/Reperfusionsschaden der Leber durch freie Radikale - direkter Nachweis mittels Elektronenspinresonanz (ESR). *Langenbecks Arch Chir* 376: 139-142
81. Ku Y, Tominaga M, Iwasaki T, Fukumoto T, Kuroda Y (2002) Isolated hepatic perfusion chemotherapy for unresectable malignant hepatic tumors. *Int J Clin Oncol* 7: 82-90
82. Langer S, Born F, Hatz R, Biberthaler P, Messmer K (2002) Orthogonal polarization spectral imaging versus intravital fluorescent microscopy for microvascular studies in wounds. *Ann Plast Surg* 48: 646-653
83. Lapointe DS, Olsen MS (1989) Alteration of hepatic tissue spaces by platelet-activating factor and phenylephrine. *Hepatology* 9: 278-284
84. Lee SG, Hwang S (2005) How I do it: assessment of hepatic functional reserve for indication of hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12: 38-43
85. Lienard D, Eggermont AM, Kroon BB, Schraffordt Koops H, Lejeune FJ (1998) Isolated limb perfusion in primary and recurrent melanoma: indications and results. *Semin Surg Oncol* 14: 202-209
86. Lindert KA, Caldwell-Kenkel JC, Nukina S, Lemasters JJ, Thurman RG (1992) Activation of Kupffer cells on reperfusion following hypoxia: particle phagocytosis in a low-flow, reflow model. *Am J Physiol* 262: G345-G350
87. Lopez-Neblina F, Toledo A, Toledo-Pereyra L (2005) Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 18: 335-350
88. Manusama ER, Nooijen PT, Stavast J, de Wilt JH, Marquet RL, Eggermont AM (1998) Assessment of the role of neutrophils on the antitumor effect of TNFalpha in an in vivo isolated limb perfusion model in sarcoma-bearing brown Norway rats. *J Surg Res* 78: 169-175
89. Manusama ER, Stavast J, Durante NM, Marquet RL, Eggermont AM (1996) Isolated limb perfusion with TNF alpha and melphalan in a rat osteosarcoma model: a new anti-tumour approach. *Eur J Surg Oncol* 22: 152-157
90. Marinelli A, Dijkstra FR, van Dierendonck JH, Kuppen PJ, Cornelisse CJ, van de Velde CJ (1991) Effectiveness of isolated liver perfusion with mitomycin C in the treatment of liver tumours of rat colorectal cancer. *Br J Cancer* 64: 74-78
91. Marx G, Schuerholz T, Pedder S, Simon T, Grime S, Sumpelmann R, Leuwer M (2006) Blood volume measurements using an integrated fiberoptic

- monitoring system in a porcine septic shock model. *Crit Care Med* 34: 1483-1488
92. Marzi I, Takei Y, Knee J, Menger M, Gores G, Bühren V, Trentz O, Lemasters J, Thurman R (1990) Assessment of reperfusion injury by intravital fluorescence microscopy following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 22: 2004-2005
93. Mavligit GM, Alexander A.Z., Charnsangajev C, Carrasco CH, Wallace S, Gutterman JU (1992) Regional biologic therapy. Hepatic arterial infusion of recombinant human tumor necrosis factor in patients with liver metastasis. *Cancer* 69: 557-561
94. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD (1993) Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74: 541-554
95. McCuskey P, McCuskey R (1984) In vivo and electron microscopic study of the development of cerebral diabetic microangiopathy. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 1: 221-244
96. McCuskey RS (1986) Microscopic methods for studying the microvasculature of internal organs. In: *Microcirculatory technology* (eds Baker, CH; Nastuk WL), Academic Press, Orlando 247-264
97. Menger MD, Lehr HA (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge from over in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14: 519-522
98. Menger MD, Marzi I, Messmer K (1991) In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 23: 158-169
99. Menger MD, Steiner D, Messmer K (1992a) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no-reflow". *Am J Physiol* 263: H1892-H1900
100. Menger M, Pelikan S, Steiner D, Messmer K (1992b) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 263: H1901-H1906
101. Menger M, Thierjung C, Hammersen F, Messmer K (1993) Dextran vs. hydroxyethylstarch in inhibition of postischemic leukocyte adherence in striated muscle. *Circ Shock* 41: 248-255
102. Meta-analysis Group In Cancer (1998) Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 16: 301-308
103. Mocellin S, Provenzano M, Lise M, Nitti D, Rossi CR (2003) Increased TIA-1 gene expression in the tumor microenvironment after locoregional administration of tumor necrosis factor-alpha to patients with soft tissue limb sarcoma. *Int J Cancer* 107: 317-322

104. Mücke I, Richter S, Menger M, Vollmar B (2000) Significance of hepatic arterial responsiveness for adequate tissue oxygenation upon portal vein occlusion in cirrhotic livers. *Int J Colorectal Dis* 15: 335-341
105. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 178: 449-460
106. Nakamoto T, Inagawa H, Takagi K, Soma G (2000a) A new Method of antitumor therapy with high dose of TNF perfusion for unresectable liver tumors. *Anticancer Res* 20: 4087-4096
107. Nakamoto T, Inagawa H, Takagi K, Tashiro K, Yoshimura H, Nishizawa T, Honda T, Kanou J, Muto Y, Amm E, Soma G (2000b) Pharmacokinetics of isolated hepatic perfusion with high dose tumor necrosis factor in rat model. *Anticancer Res* 20: 619-622
108. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC (1996) Surgical resection of colorectal carcinoma metastasesto the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. *Association Francaise de Chirurgie. Cancer* 77: 1254-1262
109. Oda M, Azuma T, Watanabe N, Nishizaki Y, Nishida J, Ishii K, Suzuki H, Komatsu H, Tsukada N, Tsuchiya M (1990) Regulatory mechanism of hepatic microcirculation: involvement of the contraction and dilatation of sinusoids and sinusoidal endothelial fenestrae. *Prog Appl Microcirc* 17: 103-128
110. Okuno K, Hirai N, Lee YS, Tarabar D, Ueno H, Yasutomi M (1998) Superiority of hepatic arterial infusion in preventing catabolism of 5-FU compared with portal vein infusion revealed by an in vivo ¹⁹F NMR study. *Cancer Chemother Pharmacol* 42: 341-344
111. Oldhafer KJ, Lang H, Frerker M, Moreno L, Chavan A, Flemming P, Nadalin S, Schmoll E, Pichlmayr R (1998) First experience and technical aspects of isolated liver perfusion for extensive liver metastasis. *Surgery* 123: 622-631
112. Otterdal K, Smith C, Oie E, Pedersen T, Yndestad A, Stang E, Endresen K, Solum N, Aukrust P, Damas J (2006) Platelet-derived LIGHT induces inflammatory responses in endothelial cells and monocytes. *Blood* 108: 928-935
113. Padera T, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira C, Brown E, Boucher Y, Choi N, Mathisen D, Wain J, Mark E, Munn L, Jain R (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 296: 1883-1886
114. Patel J, Jager A, Schalkwijk C, Corder R, Douthwaite J, Yudkin J, Coppack S, Stehouwer C (2002) Eeffects of tumour necrosis factor-a in the human forearm: blood flow and endothelin release. *Clinical Science* 103: 409-415
115. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV (1984) Human tumour necrosis factor:

- precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312: 724-729
116. Pereira PL, Trubenbach J, Schmidt D (2003) [Radiofrequency ablation: basic principles, techniques and challenges]. *Rofo* 175: 20-27
117. Radnell M, Jeppsson B, Bengmark S (1990) A technique for isolated liver perfusion in the rat with survival and results of cytotoxic drug perfusion on liver tumor growth. *J Surg Res* 49: 394-399
118. Rappaport AM, Borowy ZJ, Lougheed WM, Lotto WN (1954) Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec* 119: 11-33
119. Rath PC, Aggarwal BB (1999) TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol* 19: 350-364
120. Rees M, John TG (2001) Current status of surgery in colorectal metastases to the liver. *Hepatogastroenterology* 48: 341-344
121. Renard N, Lienard D, Lespagnard L, Eggermont A, Heimann R, Lejeune F (1994) Early endothelium activation and polymorphonuclear cell invasion precede specific necrosis of human melanoma and sarcoma treated by intravascular high-dose tumour necrosis factor alpha (rTNF alpha). *Int J Cancer* 57: 656-663
122. Renard N, Nooijen PT, Schalkwijk L, De Waal RM, Eggermont AM, Lienard D, Kroon BB, Lejeune FJ, Ruiter DJ (1995) VWF release and platelet aggregation in human melanoma after perfusion with TNF alpha. *J Pathol* 176: 279-287
123. Rothbarth J, Sparidans RW, Beijnen JH, Schultze-Kool LJ, Putter H, van d, V, Mulder GJ (2002) Reduced liver uptake of arterially infused melphalan during retrograde rat liver perfusion with unaffected liver tumor uptake. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 736-740
124. Rothbarth J, Woutersen RA, Sparidans RW, van de Velde CJH, Mulder GJ (2003) Melphalan Antitumor Efficacy and Hepatotoxicity: The Effect of Variable Infusion Duration in the Hepatic Artery. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 1098-1103
125. Ruegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P, Lejeune FJ (1998) Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma. *Nat Med* 4: 408-414
126. Schäfer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B (2003) Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. *FASEB J* 17: 660-667

127. Scheele J, tendorf-Hofmann A, Grube T, Hohenberger W, Stangl R, Schmidt K (2001) Resection of colorectal liver metastases. What prognostic factors determine patient selection? *Chirurg* 72: 547-560
128. Scheringa M, Keizer A, Jeekel J, Marquet RL (1989) Anti-Tumor effect of recombinant murine TNF-alpha (rMuTNF-a) given by continuous i.v. infusion as compared to repeated i.v. injections in a rat liver metastasis model. *Int J Cancer* 43: 905-909
129. Schlag PM, Benhidjeb T, Kilpert B (1999) Principles of curative resection of liver metastases. *Chirurg* 70: 123-132
130. Schüder G, Vollmar B, Richter S, Pistorius G, Fehringer M, Feifel G, Menger MD (1999) Epi-illumination fluorescent light microscopy for the in vivo study of rat hepatic microvascular response to cryothermia. *Hepatology* 29: 801-808
131. Schwemmler K, Link KH, Rieck B (1987) Rationale and indications for perfusion in liver tumors: current data. *World J Surg* 11: 534-540
132. Sharpe J, Hamady ZZ, Lodge JP (2005) Hepatic resection for colorectal metastasis; time to challenge the accepted doctrine. *Minerva Chir* 60: 375-389
133. Shear MJ (1941) Effect of a concentrate from *B. prodigiosus* filtrate on subcutaneous primary induced mouse tumors. *Cancer Res* 1: 731-732
134. Sherman I, Fisher M (1986) Hepatic transport of fluorescent molecules: in vivo studies using intravital tv microscopy. *Hepatology* 6: 444-449
135. Shimomura K, Manda T, Mukomoto S, Kobayashi K, Nakano K, Mori J (1988) Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: thrombus formation is a cause of anti-tumor activity. *Int J Cancer* 41: 243-247
136. Skibba JL, Quebbeman EJ (1986) Tumoricidal effects and patient survival after hyperthermic liver perfusion. *Arch Surg* 121: 1266-1271
137. Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M (1997) Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal-kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9792-9796
138. Song T-J, Adusumilli PS, Fong Y (2005) Prognostic factors in the evaluation of colorectal liver metastases. *Chirurg* 76: 535-542
139. Sorg H, Hoffmann J, Menger M, Lindenblatt M, Goehring P, Vollmar B (2006) Antithrombin is as effective as heparin and hirudin to prevent formation of microvascular thrombosis in a murine model. *Thromb Haemost* 96: 371-377
140. Stock R, Cilento E, McCuskey R (1989) A quantitative study of fluorescein isothiocyanate-dextran transport in the microcirculation of the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 9: 75-82

141. Sullivan RD, Norcross JW, Watkins E (1964) Chemotherapy of metastatic liver cancer by prolonged hepatic-artery infusion. *N Engl J Med* 270: 321-327
142. Szczesny G, Nolte D, Veihelmann A, Messmer K (2000) A new chamber technique for intravital microscopic observations in the different soft tissue layers of mouse hindleg. *J Trauma* 49: 1108-1115
143. Takasaki S, Hano, H. (2001) Three-dimensional observations of the human hepatic artery (Arterial system in the liver). *J Hepatol* 34: 455-466
144. Thorlacius H, Larmark M, Randell M, Hultberg B, Jeppsson B (2001) Isolated Liver Perfusion Permits Administration of High Doses of Chemotherapeutic Agents. *Eur Surg Res* 33: 342-347
145. Tuominen H, Svartling N, Tikkanen I, Saijonmaa O, Asko- Seljavaara S (1995) Perioperative plasma endothelin-1 concentrations and vasoconstriction during prolonged plastic surgical procedures. *Br J Anaesth* 74: 661-666
146. Vahrmeijer AL, Van der Eb MM, Van Diehrendonk JH, Kuppen PJ, Van de Velde CJ (1998) Delivery of anticancer drugs via isolated hepatic perfusion: a promising strategy in the treatment of irresectable liver metastases? *Semin Surg Oncol* 14: 262-268
147. van der Veen AH, de Wilt JH, Eggermont AM, van Tiel ST, Seynhaeve AL, ten Hagen TL (2000) TNF-alpha augments intratumoural concentrations of doxorubicin in TNF-alpha-based isolated limb perfusion in rat sarcoma models and enhances anti-tumour effects. *Br J Cancer* 82: 973-980
148. van Etten B, de Vries MR, van Ijken MG, Lans TE, Guetens G, Ambagtsheer G, van Tiel ST, de BG, de Bruijn EA, Eggermont AM, ten Hagen TL (2003) Degree of tumour vascularity correlates with drug accumulation and tumour response upon TNF-alpha-based isolated hepatic perfusion. *Br J Cancer* 88: 314-319
149. van Ijken MG, de Wilt JH, van Tiel ST, ten Hagen TL, Eggermont AM (2000) Tumor necrosis factor-alpha augments tumor effects in isolated hepatic perfusion with melphalan in a rat sarcoma model. *J Immunother* 23: 449-455
150. Virgini-Magalhaes C, Porto C, Fernandes F, Dorigo D, Bottino D, Bouskela E (2006) Use of microcirculatory parameters to evaluate chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg* 43: 1037-1044
151. Vogl TJ, Mack MG, Balzer JO (2002) Innovative Diagnostik und Therapie des kolorektalen Karzinoms. *Dtsch Ärztebl* 99: 866-867
152. Vollmar B, Rücker M, Menger MD (1996) A new method for the intravital microscopic quantification of hepatic sinusoidal perfusion failure using the dye bisbenzamide. *Microvasc Res* 51: 250-259
153. Walther MM, Jennings SB, Choyke PL (1996) Isolated perfusion of the kidney with tumor necrosis factor for localized renal-cell carcinoma. *World J Urol* 14: 2-7

154. Weaver ML, Ashton JG, Zemel R (1998) Treatment of colorectal liver metastases by cryotherapy. *Semin Surg Oncol* 14: 163-170
155. Weinreich, DM and Alexander, HR (2002) Transarterial perfusion of liver metastases. *Semin Oncol* 29:136-144
156. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J (1986) Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol* 150: 195-203
157. Wickremesekera JK, Cannan RJ, Stubbs RS (2000) Hepatic artery access ports: recognizing and avoiding the problems. *Aust N Z J Surg* 70: 496-502
158. Wortha HP, Adams J (2007) Die Rolle von Modellen in der Wissenschaft. In: Adams J (ed) *Einführung in die medizinische Biometrie*, Gustav Fischer, Jena pp. 18-19
159. Yang R, Liu Q, Rescorla FJ (1995) Experimental liver cancer: improved response after hepatic artery ligation and infusion of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Surgery* 118: 768-772
160. Zhou XD, Tang ZY, Yu YQ, Ma ZC (1988) Clinical evaluation of cryosurgery in the treatment of primary liver cancer. Report of 60 cases. *Cancer* 61: 1889-1892

DANKSAGUNG

Ohne die Hilfe der folgenden Personen wäre die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen bin ich zu tiefstem Dank verpflichtet:

Zunächst möchte ich Herrn *Professor Dr. med. Michael D. Menger*, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, danken. Sein allumfassendes Verständnis für jegliche thematische Zusammenhänge, seine stets konstruktive Kritik und die präzise Denkweise bei Analyse und Auswertung der Daten haben mich zutiefst beeindruckt. Die Diskussionen und Gespräche mit ihm, auch über fachbezogene Inhalte hinaus, haben mich nachhaltig geprägt. Mein wissenschaftliches Interesse und die damit verbundene Arbeit wurde und wird durch die Unterstützung, welche ich von ihm erfahren durfte entscheidend beeinflusst.

Besonderer Dank gilt zudem Herrn *Dr. Werner Lindemann*, Chefarzt der Klinik für Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie, Klinikum Lahr, für die Überlassung des Themas. Herr Dr. Lindemann war stets ein kompetenter Ansprechpartner, intelligenter Vordenker und engagierter Helfer. Außerdem war er mir durch seine menschliche Art und sein ärztliches Handeln in meiner Ausbildung ein großes Vorbild. Er hat mich bestärkt den Beruf des Chirurgen zu ergreifen und mich stets angespornt, weiter an mir zu arbeiten. Dafür gebührt ihm mein herzlichster Dank.

Des weiteren möchte ich mich bei *Dr. Thilo Schäfer*, Facharzt an der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes bedanken. Seine geduldige und ruhige Anleitung bei der Versuchsdurchführung sowie die Hilfe beim Erstellen der Datenbanken trugen einen entscheidenden Teil zum Gelingen dieser Arbeit bei. Ich schätze ihn als Mensch und Arbeitskollege.

Abschließend möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie bedanken. Insbesondere Frau *Janine Becker* für die Anfertigung der histologischen Präparate und immunohistochemischen Färbungen, Frau *Claudia Scheuer* und Frau *Christina Marx* für die Anzucht der Tumorzellen sowie ganz herzlich bei Frau *Elisabeth Gluding*, für die hervorragende Arbeit, die sie in allen Bereichen des Instituts leistet und ihre aufmunternde und fürsorgliche Art.

LEBENS LAUF

Name: Sperling
Vorname: Jens
Geburtsdatum: 08. April 1978
Geburtsort: Mayen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet
Konfession: katholisch
Eltern: Klaus Sperling
Ute Sperling, geb. Dahlhues

Schulbildung

1984-1988 Grundschohle Hachenburg
1988-1997 Privates Gymnasium Abtei Marienstatt
06/1997 Abitur

Zivildienst

1997-1998 Kreiskrankenhaus Hachenburg, allgemeinohirurgische Station

Universität

09/2001 Ärztliche Vorprüfung
09/2002 Erstes Staatsexamen
03/2005 Zweites Staatsexamen
04/2006 Drittes Staatsexamen

Famulaturen

02/2002	Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes
02/2003	Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes
08/2003	Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes
03/2004	Orthopädische Gemeinschaftspraxis, Herr Dr. Peter Friedel und Frau Dr. Ute Münch, Homburg

Praktisches Jahr

04-08/2005	Innere Medizin: Klinik für Innere Medizin II (Gastroenterologie - Hepatologie, Endokrinologie - Diabetologie, Ernährungsmedizin), Klinik für Innere Medizin I (Hämatologie, Onkologie, Infektiologie); Universitätsklinikum des Saarlandes
08-12/2005	Radiologie: Klinik für Diagnostische und interventionelle Radiologie; Universitätsklinikum des Saarlandes
12/2005-03/2006	Chirurgie: Klinik für Unfallchirurgie, Klinik für Visceral- und Transplantationschirurgie, Klinik für Wiederherstellungschirurgie; Universitätsspital Zürich, Schweiz

Ärztliche Tätigkeit

Seit 07/2006 Assistenzarzt in der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. M. Schilling), Universitätsklinikum des Saarlandes

Publikationen und Kongressteilnahmen

TNF- α in isolated in situ hepatic perfusion induces selective shutdown of capillary perfusion and apoptotic cell death in colorectal metastasis.

Lindemann W, Schäfer T, Sperling J, Schilling MK, Menger MD; *submitted*

vorgetragen:

41. Congress of the European Society of Surgical Research, 17.05.-20.05.2006, Rostock-Warnemünde, BRD

Sperling J, Dold S, Lindemann W, Richter S, Schäfer T, Schilling MK, Menger MD

TNF- α in isolated hepatic perfusion induces selective shutdown of capillary perfusion and apoptotic cell death in colorectal metastasis. *Eur Surg Res 2006; 38(suppl 1): 1-152*

Sperling J, Dold S, Kollmar O, Richter S, Schilling MK, Menger MD

Hepatic arterial infusion of TNF- α induces temporary hepatic arterial hyperperfusion with microvascular dysfunction. *Eur Surg Res 2006; 38(suppl 1): 1-152*

124. Kongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 01.05.-04.05.2007, München, BRD

J. Sperling, T. Schäfer, W. Lindemann, M. Schilling, M.D. Menger

Die hepato-arterielle Infusion von rh-TNF-alpha induziert ein kapillares Perfusionsversagen und apoptotischen Zelltod in Lebermetastasen kolorektaler Karzinome. *Chirurgisches Forum 2007, Springer Verlag Heidelberg, Band 36, S. 163-164*

Homburg, den 05.09.2007