

Aus der Klinik für Allgemeinchirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Herr Prof. Dr. med. M. K. Schilling
Doktorvater: Herr PD Dr. med. O. Kollmar

**Rapamycin vermindert das Wachstum kolorektaler
Metastasen nach Leberresektion durch Hemmung der
Angiogenese und Tumorzellproliferation**

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von: Christian Dahlem
geb. am: 12.10.1981 in Heidelberg

Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger

Gutachter: 1.

2.

3.

Datum der Promotion:

**Für meinen Vater
Michael Dahlem**

Inhaltsverzeichnis

1.1 Zusammenfassung

1.2 Abstract

2 Einleitung

2.1 Das kolorektale Karzinom

2.2 Mechanismen und Wege der Metastasierung

2.3 Angiogenese von Tumoren

2.4 Leberresektion, Leberregeneration und Tumorwachstum

2.5 Immunsuppression und Tumorwachstum

2.5.1 Cyclosporin

2.5.2 Rapamycin

2.6 Ziele der Arbeit

3 Material und Methodik

3.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

3.2 Tumorzelllinie und Kulturbedingungen

3.3 Narkose führen, während der Versuche

3.4 Präparation der Rückenhautkammern

3.5 Laparotomie und Leberresektion

3.6 Tumorzellimplantation

3.7 Experimentelles Protokoll

3.8 Intravitalmikroskopie

3.9 Auswertung der Intravitalmikroskopie

3.10 Histologie und Immunhistochemie

3.11 Statistische Auswertung

4 Ergebnisse

- 4.1 Tumorwachstum unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung*
- 4.2 Tumorangiogenese unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung*
- 4.3 Leukozytenadhäsion unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung*
- 4.4 Tumorzellproliferation und –apoptose unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung*
- 4.5 Mortalität nach Leberresektion*
- 4.6 Leberregeneration unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung*
- 4.7 Tumorwachstum nach Leberresektion*
- 4.8 Angiogenese nach Leberresektion*
- 4.9 Leukozytenadhäsion nach Leberresektion*
- 4.10 Tumorzellproliferation und –apoptose nach Leberresektion*

5 Diskussion

- 5.1 Das Tierversuchsmodell*
- 5.2 Tumorwachstum unter Rapamycin und Cyclosporin*
- 5.3 Angiogenese unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung*
- 5.4 Tumorwachstum nach Leberresektion unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung*
- 5.5 Angiogenese nach Leberresektion unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung*
- 5.6 Inflammatorische Antwort unter Rapamycin und Cyclosporinbehandlung*
- 5.7 Schlussfolgerung*

6 Literaturverzeichnis

7 Publikationen

8 Danksagung

9 Lebenslauf

1 Zusammenfassung

Die chirurgische Resektion ist der „Goldstandard“ in der Therapie kolorektaler Lebermetastasen. Trotz moderner chirurgischer Techniken und Chemotherapie ist jedoch die Rezidivrate mit 60-70% nach Leberresektion hoch. Im Rahmen der Leberregeneration nach Resektion kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, welche das Wachstum von intra- und extrahepatischen Mikrometastasen fördern können. Da dem mTOR Inhibitor Rapamycin eine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum zugeschrieben wird, wurden in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von Rapamycin auf das Wachstum extrahepatischer Mikrometastasen in einem Mausmodell mittels Intravitalmikroskopie und histologischer / immunhistochemischer Techniken untersucht. Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde der Einfluß von Rapamycin auf das extrahepatische Tumorwachstum nach erweiterter Leberresektion untersucht. Mit Cyclosporin oder PBS-behandelte Tiere dienten jeweils als Kontrolle. Der mTOR Inhibitor Rapamycin besitzt hemmende Effekte auf das metastatische Tumorwachstum. Allerdings gab es bisher noch keine Untersuchungen, die eine solche Wirksamkeit auch im Rahmen einer Leberresektion belegten. Aus diesem Grund wurden in dieser Studie die Eigenschaften von Rapamycin auf das metastatische Tumorwachstum nach Leberresektion an einem Mausmodell untersucht. Allen Tieren wurden Zellen eines Kolonkarzinoms in eine Rückenhautkammer implantiert und bei einer Hälfte der Tiere eine 70 prozentige Leberresektion durchgeführt, bei der anderen Hälfte eine Laparotomie als Kontrolle. Die Mäuse erhielten ein Placebo, Cyclosporin oder Rapamycin als Medikamente. Die implantierten Tumore wurden am 0., 4., 8. und 12. Tag nach Tumorimplantation intravitalmikroskopisch untersucht, wobei Tumorgroße, Kapillardichte, Fließgeschwindigkeit des Blutes, Kapillardurchmesser,

Leukozytenadhäsion, Proliferation und weitere Parameter quantitativ erfasst wurden. Durch diese Studie konnte so zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass der mTOR Inhibitor Rapamycin im Vergleich zur Behandlung mit Cyclosporin oder einem Placebo durch Hemmung der Tumorzellproliferation und der Neoangiogenese in der Lage ist, das Wachstum extrahepatischer kolorektaler Metastasen nach 70 prozentiger Leberresektion signifikant zu vermindern, ohne die Leberregeneration zu beeinflussen. Weiterhin ist die Behandlung mit Rapamycin im Gegensatz zu Cyclosporin nicht mit einer erhöhten postoperativen Mortalität vergesellschaftet. Die Behandlung mit Rapamycin bietet somit eine interessante neue Möglichkeit, Tumorrezidiven nach Leberresektion aufgrund kolorektaler Metastasen vorzubeugen.

1.2 Abstract

Surgical resection is the “gold standard” in the therapy of colorectal metastases. In spite of modern surgical techniques and chemotherapy the recidiv rate however is with 60-70% after liver resection still high. The process of liver regeneration leads to a release of cytokines and chemokines, wich are able to stimulate the growth of intra- and extrahepatic liver metastases. The mTOR inhibitor Rapamycin is attributed to have inhibitory effects on tumor growth, from there the present study investigated the influence of rapamycin on growth of extrahepatic micrometastases in mouse model through intravital microscopy and histological / immunhistochemical techniques. In the second part of this study the influence of Rapamycin on extrahepatic tumorgrowth after extended hepatectomy was investigated. Cyclosporin or PBS treated animals served as controls. The mTOR inhibitor Rapamycin suppresses metastatic tumor growth, however there has been no studies showing these results even after liver resection. Therefore we studied the effects of Rapamycin on metastatic tumor growth in a mouse model. All animals underwent implantation of colorectal cancer cells in a dorsal skinfold chamber. All animals underwent laparotomy, half of them were hepatectomized to an extent of 70 percent, the other animals served as controls. Mice were sham treated, received Cyclosporin or Rapamycin. The implanted tumors were observed at day 0, 4, 8 and 12 after tumor implantation and tumor area, capillary density, red blood cell velocity, capillary diameters, leukocyte adhesion, proliferation and further parameters were quantitatively analyzed. This study indicates for the first time that the mTOR inhibitor Rapamycin is able to reduce significantly, compared to placebo and Cyclosporin treatement, tumor growth of extrahepatic colorectal metastases after 70 percent hepatectomy through suppression of tumor cell proliferation and angiogeneses,

without impairing liver regeneration. Furthermore treatment with Rapamycin in contrast to treatment with Cyclosporin is not accompanied with an increased post operative mortality. Treatment with Rapamycin is therefore an interesting new strategy to prevent recurrence of colorectal metastases after liver resection.

2 Einleitung

2.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland mit 12 bis 14 Prozent die zweithäufigste Krebstodesursache beider Geschlechter. Das Prädispositionsalter liegt bei 65 Jahren. Jährlich kommt es in Deutschland zu 68750 Neuerkrankungen (2006) und 27225 Todesfällen (2006) durch das kolorektale Karzinom (Husmann G 2010). Die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms ist ungeklärt, allerdings sind sowohl exogene, als auch endogene Faktoren bekannt, die die Ausbildung eines Karzinoms begünstigen. Zu den exogenen Faktoren zählen fettreiche und ballaststoffarme Ernährung, zu den endogenen Faktoren vorbestehende Adenome, entzündliche Darmerkrankungen, familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre non Polyposis Kolonkarzinom (HNPCC) (Bodmer WF 1987, Lynch HT 1985, Lennard-Jones JE 1977). Die Metastasierung erfolgt lymphogen in regionäre und mesenteriale Lymphknoten entlang der arteriellen Gefäße und hämatogen über die Vena portae in Leber und Lunge. Die Prognose ist abhängig von Stadium, Differenzierungsgrad, Lokalisation und Ausmaß der Metastasierung bei Diagnosestellung (Souza-Offtermatt G 2004). Bei 15-25 Prozent der Patienten mit der Diagnose eines kolorektalen Karzinoms bestehen bereits synchrone Metastasen in der Leber (Hölzel D 2008). Bei mehr als der Hälfte der Patienten, die an einem Kolonkarzinom sterben, findet man bei der Autopsie Lebermetastasen; wobei die Metastasierung die Todesursache darstellt (Yoon SS 1999).

2.2 Metastasierung

Damit Tumoren metastasieren, also Tochtergeschwülste in anderen Organen bilden, bedarf es bestimmter Voraussetzungen. Als erstes kommt es zu einem Funktionsverlust von Genen, die für Zelladhäsionsmoleküle kodieren (z. B. E-Cadherin, Inhibitoren von Metalloproteinasen (TIMP)). Die Tumorzellen beginnen Motilitätsfaktoren und Chemokine zu bilden, die ihre Beweglichkeit untereinander fördern (Tucci MG 2007). Durch die Bildung von Matrixmetalloproteinasen unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren (bFGF, TGF- β), lösen sie sich aus dem Zellverband und der Extrazellulärmatrix und können nun in umgebendes Gewebe und Gefäße einwandern (Gohji K 1998). Um nicht vom Immunsystem angegriffen zu werden schützen sich die Zellen durch eine verminderte Bildung von HLA-Molekülen auf der Zelloberfläche, sowie eine Fibrinummantelung (Atkins D 2004). In kleinen Gefäßen und Kapillaren bleiben die Tumorzellen stecken (Seed and Soil Theory). In welchem Organ sich eine Tumorzelle absiedelt hängt zum einen davon ab, welches Organ als nächstes stromabwärts liegt (im Falle des Kolonkarzinoms z.B. die Leber, im Falle des Rektumkarzinoms z.B. Leber und Lunge), aber auch von organspezifischen Adhäsionsmolekülen (Ig-Familie), Chemokine (Homing Theory) (Müller A 2001) und Wachstumsfaktoren (Kollmar O 2010, Rubie C 2008, Kollmar O 2008, 2007 a,b, 2006 a,b). Die Zellen heften sich an das Endothel und dringen ins Organgewebe ein. Mit ihren eigenen oder induzierten Angiogenesefaktoren bewirken sie den Aufbau eines, die Metastase versorgenden, Gefäßsystems (Konstantinopoulos PA 2007). Im Falle des kolorektalen Karzinoms erfolgt die Metastasierung vor allem in die Leber, wobei in 25 Prozent der Fälle die Leber der einzige Fernmetastasierungsort ist (Yoon SS 1999).

2.3 Angiogenese

Der Begriff Angiogenese steht für die Ausbildung neuer Blutgefäße. Angiogenese ist essentiell für die Ausbildung von Tumoren und Metastasen. Diese Vermutung wurde 1971 das erste Mal von J. Folkman aufgestellt, welcher beobachtete, dass ab einer Tumorgöße von zwei bis drei Millimeter im Durchmesser die Ausbildung von Gefäßen nötig wird, um die Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen (Folkman J 1971). Der Wechsel zum angiogenetischen Tumortyp hängt von einer Balance zwischen angiogenetischen Stimulatoren und Inhibitoren ab, die sowohl von den Tumorzellen selbst, als auch von bestimmten Host-Zellen, wie z.B. Makrophagen oder Bindegewebszellen gebildet werden können (Sierra JR 2008, Konstantinopoulos PA 2007). Der wichtigste Wachstumsfaktor, der die Angiogenese in Kolonkarzinomen reguliert, ist Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Ellis LM 2003), weitere Wachstumsfaktoren sind Angiopoietin 1 und 2 (ANG-1, ANG-2), Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Platelet Derived Growth Factor B (PDGF-B) und Ephrin-B2. Ein Hauptstimulus für Tumorangiogenese ist Hypoxie. Diese aktiviert Hypoxia-Inducible Transcriptions Factor (HIF-1 α), welcher wiederum die Expression von VEGF, bFGF, PDGF und ANG-2 bewirkt (Humar R 2002). Alle diese Faktoren beeinflussen den PI3K/AKT/mTOR Signalweg in Tumor- und Endothelzellen (Guba M 2002), wobei mTOR wiederum die Translation von HIF-1 α erleichtert (Arsham AM 2002). Viele Strategien zur Behandlung von Tumoren und speziell des kolorektalen Karzinoms zielen daher auf eine Inhibition dieser Faktoren bzw. Signalwege.

2.4 Leberresektion, Leberregeneration

In der Behandlung kolorektaler Lebermetastasen ist der therapeutische Gold-Standard (Abdalla EK 2004) mit kurativer Zielsetzung die Leberresektion, mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 40 Prozent. Unbehandelt versterben alle Patienten an ihrer Metastasierung und haben eine mittlere Lebenserwartung von 12 Monaten (Andromanakos N 2007; Wei AC 2006).

Seit Durchführung der ersten Leberresektion 1940 durch Cattell kam es durch Verbesserung der operativen Techniken und neoadjuvante Therapien zu einer Erweiterung der Indikationsstellung (Pawlik TM 2008). Allerdings kommt es bei 60-70 Prozent der Patienten, bei denen eine Leberresektion aufgrund von Metastasen eines kolorektalen Karzinoms durchgeführt wird, zu einem Rezidiv (Muratore A 2010, Bennett JJ 2008). Schon in der griechischen Mythologie wurde bei Prometheus ein Nachwachsen der Leber beschrieben, von der der Adler Ethon immer wieder ein Stück fraß. Leberzellen sind potentiell teilungsfähig und bewirken ein Wachstum der Restleber auf das Ausgangsgewicht vor der Resektion. Dies geschieht im Tiermodell der Ratte innerhalb von 10 Tagen (Nagy P 2001). Im Rahmen der funktionellen und morphologischen Regeneration kommt es zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren und angiogenetischen Cytokinen, wie z.B. Hepatocyte growth factor (HGF), VEGF, bFGF, Insulin-Like Growth Factor (IGF), Epidermal Growth Factor (EGF) (Harun N 2007, Yoon SS 2006, Oe H 2005, Redaelli CA 2004). HGF, IGF und EGF werden nach Leberresektion vermehrt ausgeschüttet und bewirken einen mitotischen Stimulus der zu einer raschen Proliferation der Leberzellen führt (Lukomska B 2004, De Jong JS 2001, 1998, Matsumoto K 1991).

Neben der Wiederherstellung von Lebergewebe können diese Faktoren ein Wachstum von soliden Tumoren aus inaktiven Mikrometastasen und zirkulierenden

Tumorzellen bewirken, was mitunter die oben beschriebene hohe Rezidivrate erklärt (Picardo A 1998; De Jong JS 1995; Panis Y 1992). HGF und EGF stimulieren Zellproliferation, Motilität, Angiogenese, Endothelzell-Migration und Kapillarbildung in vivo (Saloman DS 2000; Tolnay E 1998), IGF 1 und 2 sind starke Mitogene für viele Tumorzelllinien, auch für das Kolonkarzinom (Singh P 1996, Le Roith D 1995). Verschiedene Studien haben eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der Leberresektion und der Stimulation des Tumorwachstums aufgezeigt (Rupertus K 2007, Harun N 2007, Picardo A 1998, Slooter GD 1995). K. Rupertus konnte zeigen, daß sowohl eine 30- als auch eine 70-prozentige Leberresektion bei Mäusen das Wachstum von extrahepatischen Metastasen im Vergleich zu nicht resezierten Tieren fördert. Es fanden sich in beiden Fällen erhöhte Werte des Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). Allerdings bewirkt nur die 70-prozentige Leberresektion eine beschleunigte Ausbildung des versorgenden Gefäßsystems (Rupertus K 2007).

.

2.5 Immunsuppression und Tumorwachstum

Bei der therapeutischen Übertragung parenchymatöser Organe handelt es sich um allogene Transplantationen, d.h. Spender und Empfänger sind genetisch unterschiedlich. Bei Allotransplantationen besteht zwischen Spender und Empfänger stets eine mehr oder weniger ausgeprägte Antigendifferenz. Transplantationsantigene, auch Histokompatibilitätsantigene genannt, sind beim Menschen von einer Gengruppe kodiert, dem sogenannten HLA-Komplex (HLA = humane Leukozytenantigene). Das Genprodukt sind Glykoproteine, die in der Zytoplasmamembran verankert sind. Man unterscheidet HLA-Klasse-I-Antigene: HLA-A, -B, -C, die auf allen kernhaltigen Organ- und Blutzellen vorkommen und HLA-

Klasse-II-Antigene: HLA-DR, -DQ, -DP, die sich auf dendritischen Zellen (Makrophagen, aktivierte T- und B-Lymphozyten) befinden. Als Transplantationsantigene wirken auch Blutgruppenmerkmale (AB0-System). Die große Vielzahl verschiedener HLA-Antigene und deren unterschiedliche Kombination erklärt, dass die meisten Menschen untereinander HLA different sind. Die Abstoßungsreaktion beruht auf der Erkennung der fremden Antigene des Transplantats durch Zellen des Empfängerimmunsystems. Für die komplexe Immunreaktion spielt die Antigenpräsentation durch Makrophagen des Empfängers eine wesentliche Rolle. Die Zerstörung des Transplantats (Abstoßung) erfolgt überwiegend durch sensibilisierte Lymphozyten (zelluläre Immunantwort) und durch Antikörper (humorale Immunantwort). Zum Erhalt des transplantierten Organs ist eine immunsuppressive Therapie notwendig, um die Immunantwort des Empfängers gegen die Transplantationsantigene des Spenderorgans dauerhaft zu unterdrücken. Obwohl die Häufigkeit einer Abstoßungsreaktion im ersten halben Jahr nach Transplantation am höchsten ist, so ist doch die dauerhafte Einnahme immunsuppressiver Medikamente während der gesamten Lebenszeit unabdingbar. Man unterscheidet verschiedene medikamentöse Ansätze, die sich auf fünf Säulen stützen: Steroide (z.B. Prednisolon), Calcineurin-Inhibitoren (z.B. Ciclosporin), mTOR-Inhibitoren (z.B. Sirolimus (Rapamycin)), Antimetabolite (z.B. Azathioprin), sowie mono- und polyklonale Lymphozytenantikörper (Basiliximab) (Henne-Bruns D 2007).

Ein Hauptproblem der immunsuppressiven Therapie nach Transplantationen ist das vermehrte Auftreten maligner Tumore, die sich bei 15-20 Prozent der Patienten innerhalb von 10 Jahren und bei bis zu 40 Prozent innerhalb von 20 Jahren entwickeln. Sie tragen essentiell zur Morbidität und Mortalität dieser Patienten bei. In den meisten Fällen handelt es sich um Hauttumore und lymphoproliferative

Erkrankungen (Delgado M 2008, Arichi N 2008, Lutz J 2003, Fung JJ 2001). Allerdings werden immunsuppressive Medikamente heute auch auf ihre antitumoralen Effekte hin untersucht, da sich gezeigt hat, dass einige Medikamente neben der Schwächung des Immunsystems, die für das Auftreten maligner Erkrankungen und Infektionen verantwortlich ist, auch eine Hemmung des Tumorwachstums und der Angiogenese bewirken. Zur Reduktion der Rezidivrate nach radikaler Resektion von kolorektalen Metastasen beschäftigt man sich zur Zeit intensiv mit der Suche nach postoperativen medikamentösen Therapien, die einen möglichen positiven Effekt auf das Überleben haben (Nordlinger B 2008, Taieb J 2005). In diesem Zusammenhang müssen sowohl anti-proliferative, als auch anti-angiogentische chemotherapeutische Strategien untersucht werden, da der hemmende Effekt dieser Substanzen auf das beschleunigte Tumorwachstum nach Leberresektion bereits in experimentellen Studien nachgewiesen wurde (Dixler TA 2000, Slooter GD 1995).

2.5.1 Cyclosporin A

Die biologischen Eigenschaften von Cyclosporin A wurden das erste Mal 1976 von Borel et al. beschrieben (Borel JF 1976). Das Pilzderivat Cyclosporin A (CsA) hat dramatisch zur Erweiterung der Perspektiven in der Transplantation beigetragen. Das zyklische Protein aus 11 Aminosäuren inhibiert sehr spezifisch die T-Zell-Aktivierung, während es auch Auswirkungen auf einige B-Zell Antworten hat (Klaus GG 1984). Bei einer Transplantation wurde Cyclosporin zum ersten Mal 1978 eingesetzt.

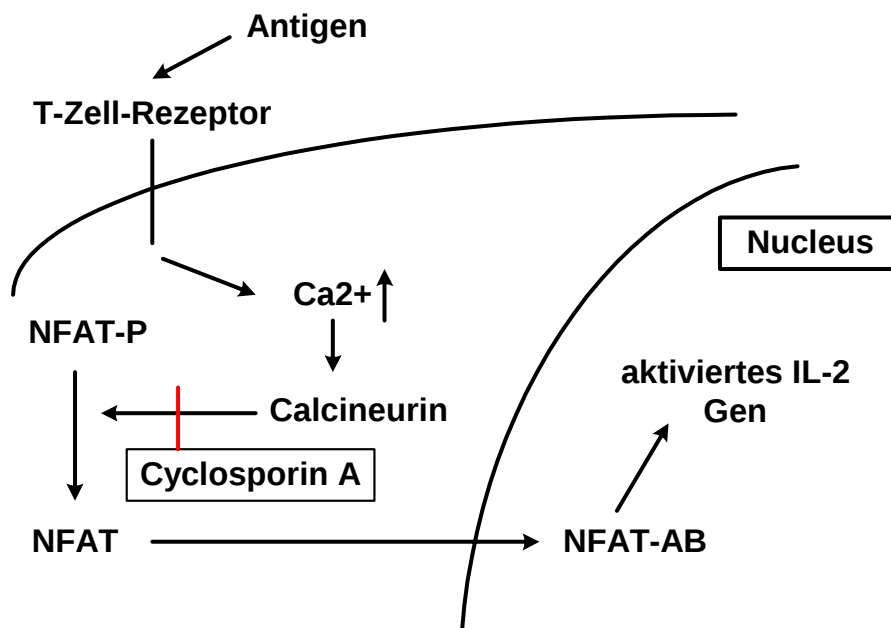


Abb. 1: Darstellung der Wirkmechanismus von Cyclosporin A nach Lu CY 1993)

Cyclosporin A bindet intrazellulär an den Rezeptor Cyclophilin. Dieser Komplex inhibiert die Funktion des Enzyms Calcineurin. Dadurch wird die Translokation der zytoplasmatischen Komponente von NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cells) in den Zellkern verhindert, was die Aktivierung der durch diesen Transkriptionsfaktor regulierten Gene verhindert. Zu diesen Genen zählen die zur B-Zell Aktivierung nötigen Interleukin (IL-4)- und CD40-Ligand-kodierenden und die für die T-Zell Proliferation nötigen, z.B. IL-2-kodierenden Gene (Ho S 1996). Hauptnebenwirkung ist die Nephrotoxizität.

Cyclosporin A besitzt aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung potentiell einen wachstumsfördernden Effekt auf Tumore. Das geschwächte Immunsystem kann die entarteten Zellen nicht mehr erkennen und zerstören, so dass ein erhöhtes Risiko für das Auftreten neuer maligner Tumore bzw. eines stärkeren Wachstums bereits vorhandener, noch nicht diagnostizierter Karzinome oder Metastasen besteht (Hojo M 1999). Dennoch werden die Wirkungen des Medikaments auf das Tumorwachstum kontrovers diskutiert. Es gibt Untersuchungen, die einen möglichen positiven Effekt

von Cyclosporin A auf die Ausbildung von Tumoren, z.B. durch eine vermehrte Ausschüttung von vascular endothelial growth factor zeigen (Basu A 2008, Van de Vrie W 1997). Im Gegensatz dazu belegen einige in vitro und in vivo Studien einen anti-Tumor Effekt von Cyclosporin A sowohl bei Lungen- und Gastrointestinaltumoren, als auch bei Gliomen (Zupanska A 2005, Van de Vrie W 1997, Piontek M 1994; Twentyman PR 1988; Saydjari R 1987, 1986).

2.5.2 Rapamycin

Rapamycin ist ein lipophiles bakterielles Makrolid mit antifungaler und immunsuppressiver Wirkung (Dumont FJ 1990, Sehgal SN 1998). Entdeckt wurde die Substanz vor mehr als zwanzig Jahren während der Suche nach neuen Antibiotika in den Ayerst Research Laboratories. Es wurde aus einem Stamm von *Streptomyces hygroscopicus* gewonnen, den man in einer Bodenprobe der Osterinseln (Rapa Nui) gefunden hatte (Vezina C 1975). Nach Bildung eines Komplexes mit dem FK-bindenden Protein FKBP-12 kommt es intrazellulär zu einer hoch affinen Bindung mit dem mammalian Target Of Rapamycin (mTOR). Diese Interaktion führt über den Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Signalweg zur Dephosphorylierung und Inaktivierung von p70S6, einer Kinase, die zur Produktion ribosomaler Komponenten für Proteinsynthese und Zellteilung nötig ist. Es kommt zum Arrest in der G1 Phase (Gridelli C 2008, Wiederecht GJ 1995), zur Immunsuppression durch Inhibition der Interleukin-2 gesteuerten T-Zell Teilung und zur Vermeidung der Abstoßungsreaktion bei Organtransplantationen (Flechner SM 2008, Kahan BD 2000).

Neben der immunsuppressiven Wirkung zeigte sich bei Rapamycin in einigen in vitro und in vivo Studien ein antiproliferativer und antiangiogentischer Effekt (Gridelli C 2008, Bianco R 2008, Guba M 2002). Zu einer Hemmung des Wachstum von Tumoren und der Ausbildung von Metastasen kommt es wahrscheinlich durch eine Verminderung der Freisetzung von Vascular endothelial growth factor (VEGF) und damit zu einer reduzierten Neubildung von Tumor-versorgenden Gefäßen (Boffa DJ 2004; Koehl GE 2004, Luan FL 2003; Guba M 2002; Luan FL 2002). An einem Maus Modell des metastasierten Kolonkarzinoms konnten Guba und seine Mitarbeiter nachweisen, dass normale immunsuppressive Dosen von Rapamycin, höchst wahrscheinlich durch Unterdrückung der Tumorneoangiogenese, das Tumorstadium vermindern konnten (Guba M 2002). Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse aus präklinischen Studien laufen zur Zeit einige klinische Versuche, die die Effekte von mTOR Inhibitoren auf solide Malignome, wie nichtkleinzellige Bronchialkarzinome, Nierenzellkarzinome, gynäkologische Karzinome und gastrointestinale Tumore untersuchen (Gridelli C 2008), auch wenn gezeigt wurde, dass eine Behandlung mit Rapamycin die Ausschüttung für die Leberregeneration wichtiger Wachstumsfaktoren, wie z.B. platelet-derived growth factor B (PDGFB), hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) und transforming growth factor β 1 (TGF β 1), als auch angiogenetischer Faktoren, wie vascular endothelial growth factor A (VEGFA) und Angiopoietin-1 (Ang-1) verhindert (Palmer D 2008)

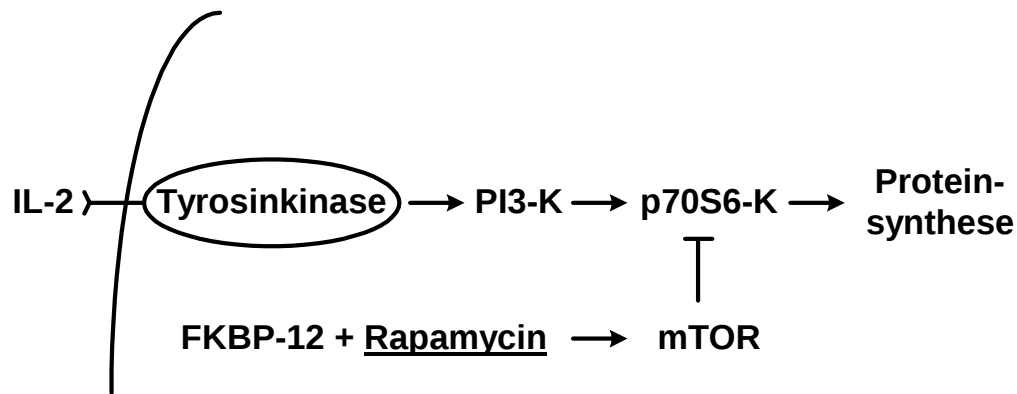


Abb. 2: Darstellung des Wirkmechanismus von Rapamycin

2.6 Ziele der Arbeit

- Untersuchung des Einflusses von Rapamycin und Cyclosporin auf das Tumorstadium von extrahepatischen Tumoren nach 70-prozentiger Leberresektion im Mausmodell
- Untersuchung des Einflusses von Rapamycin und Cyclosporin auf die Angiogenese von extrahepatischen Tumoren nach 70-prozentiger Leberresektion im Mausmodell
- Bestimmung der „Gefäßreife“ extrahepatischer Tumoren nach 70-prozentiger Leberresektion durch Bestimmung petechialer Einblutungen in die Tumore nach Therapie mit Rapamycin und Cyclosporin
- Untersuchung der Leukozytenadhäsion unter Rapamycin und Cyclosporin in extrahepatischen Tumoren nach Leberresektion
- Erfassung von Tumorzellproliferation und Apoptose extrahepatischer Tumoren bei Behandlung mit Rapamycin und Cyclosporin nach 70-prozentiger Leberresektion im Mausmodell

- Untersuchung des Einflusses von Rapamycin und Cyclosporin auf die Mortalität bei extrahepatischen Tumoren und Zustand nach 70-prozentiger Leberresektion im Mausmodell

3 Material und Methodik

3.1 Versuchstiere und Haltung

Die Experimente wurden nach Zustimmung durch die örtliche Tierschutzbehörde des Ministeriums für Gesundheit und Soziales im Saarland nach den Richtlinien des United Kingdom Co-ordinating Committees (UKCCCR) für das Wohl der Tiere in der Krebsforschung und den Prinzipien und Richtlinien für die Nutzung von Tieren in der Forschung (New York Academy of Sciences Ad Hoc Committee on Animal Research, New York, USA) durchgeführt. Für die Experimente wurden weibliche BALB/c – Mäuse (Charles River Labore GmbH; Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 20 bis 22 g verwendet. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen bei einer Raumtemperatur von 22 bis 24°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 bis 65 Prozent in einem 12 Stunden Tag/Nacht-Zyklus gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standard-Labor-Futter (Altromin®; Lage, Germany).

3.2 Tumorzelllinie und Kulturbedingungen

Die CT26 Zell-Linie entstammt einem durch N-nitroso-N-methylurethan induzierten undifferenzierten Adenokarzinom des Kolons der Maus. Verwendet wurden GFP-transfizierte CT-26 Zellen bis zur zweiten Passage. Für die Arbeit wurde die CT26-GFP Zelllinie in Zellkultur als Monolayer in RPMI-1640 mit Zusatz von 2 mmol L-Glutamin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), ergänzt mit 10 % Kalbserum (FCS Gold, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 100 U/ml

Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gezüchtet. Die Zellen waren bei 37°C in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid inkubiert. Am Tag der Tumorzellimplantation wurden die CT26-GFP Zellen durch Trypsinierung (0,05 Prozent Trypsin und 0,02 Prozent EDTA, PAA Laboratories GmbH) von den Subkulturen (70-85 Prozent) getrennt und zweimal in Phosphatpuffer-Lösung (PBS) gewaschen. Das resultierende Pellet wurde noch zweimal zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

3.3 Narkoseführung während der Versuche

Vor Durchführung jeder Narkose wurde das Körpergewicht der Tiere bestimmt. Zur Anästhesie der Mäuse diente ein Gemisch aus 0,75 ml Ketavet® (1ml = 120mg Ketaminhydrochlorid, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland), 1 ml Rompun® 2% (1ml = 20mg Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 8,25 ml 0,9 prozentige Natrium-Chlorid-Lösung. Die Maus erhielt von dieser Mischung 0,1 ml + 10 Prozent pro 10 Gramm Körpergewicht intraperitoneal.

3.4 Präparation der Rückenhautkammer (Menger et al. 2002, Lehr et al. 1993)

Zuerst wurden die Kammerteile entsprechend zwei symmetrischen Titanrahmen, drei Schrauben, sechs Muttern, einem Sprengring (Gewicht 3,2 Gramm) und das Instrumentarium (zwei kleine gerade anatomische Klemmchen, eine anatomische Pinzette, eine kleine spitze Präparationsschere, eine anatomische Mikropinzette gerade, eine anatomische Mikropinzette gebogen, eine Mikropräparationsschere, ein

Nadelhalter, zwei kleine ledige Nadeln) für 15 Minuten in Braunol (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) eingelegt. Als nächstes folgte eine Reinigung der Teile für 15 Minuten bei 80°C im Ultraschallbad. Dann wurden die Schrauben mit Muttern an einem der Titanrahmen fixiert. Nach Trocknung der Kammerteile und des Instrumentariums auf einem OP-Tuch erfolgte eine nochmalige Desinfektion von beiden Seiten mit 70 %-igem Ethanol.

Die Versuchstiere erhielten die Narkose und wurden am gesamten Rücken und an den Flanken vom Schwanz bis in den Nacken mit einem Haartrimmer rasiert (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland). Die Enthaarungscreme (Plica med, ASID BONZ GmbH, Böblingen, Deutschland) wurde auf den rasierten Bereich aufgetragen und 10 Minuten einwirken gelassen. Nach Entfernung der Creme mit dem dazugehörigen Spatel erfolgte eine zweite Applikation für weitere drei Minuten. Danach wurde die Creme endgültig entfernt und die Tiere unter fließendem, warmen Wasser abgewaschen. Die Tiere wurden mit einer Kompresse abgetrocknet und die rasierte Haut mit Softa-Sept (B. Braun Melsungen AG) desinfiziert.

Die Rückenhaut der Mäuse wurde mit Daumen und Zeigefinger beider Hände aufgespannt und so eingestellt, dass sich die großen Gefäße in diesem Hautlappen unter Gegenlicht (Kaltlichtlampe (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland)) überdeckten. Nach Fixierung der Tiere in dieser Position kranial (in Höhe der Vorderbeine) und kaudal (in Höhe der Hinterbeine) mit vorgelegten Haltefäden (Bindefaden) an einer quer verlaufenden Stange mit Pflasterstreifen (Leukosilk), erhielt die Maus eine gerollte Kompresse als Aspirationprophylaxe unter den Kopf.

Eine Hälfte der Kammer wurde auf der rechten Seite mit zwei Fäden zentral an der Haut fixiert. Zwei, mit einer kleinen Schere geschnittene Öffnungen durch die beiden Hautlappen dienten als Durchtrittspunkte für die körpernahen Schrauben. Die

Schrauben wurden durch die Rückenhaut hindurchgeführt und die Haut mit zwei geraden Klemmchen auf die Muttern heruntargeschoben und dort fixiert. Danach erfolgte die Befestigung der ersten Kammerhälfte mit zwei weiteren Fäden lateral.

Unter Verwendung des Gegenlichtes ließ sich auf den linksseitigen Hautlappen die kreisförmige Aussparung der Kammer aufzeichnen (Durchmesser circa 13 Millimeter). Nach Abnahme der Tiere von der Halterung, wurden die Tiere zur Hautpräparation auf eine Komresse gelegt. Die Fixierung der Kammer und der Haut erfolgte zusätzlich mit zwei Haltefäden auf einer Korkplatte.

Unter Verwendung des OP-Mikroskops (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) (16 fache Vergrößerung), der anatomischen Pinzette und der kleinen Präparierschere wurden Cutis und Subcutis des linksseitigen Hautlappens abpräpariert. Die großen horizontal verlaufenden Gefäße wurden sichtbar. Zur Spülung diente NaCl-Lösung und eine gleichzeitig an den Rand der Hautöffnung gehaltene kleine Komresse, um die überschüssige Flüssigkeit direkt wieder zu entfernen. Subcutanes Fettgewebe, Hautmuskel und vertikal verlaufende Gefäße wurden Schicht für Schicht mit der Mikroschere und der kleinen anatomischen Pinzette abpräpariert bis die großen Gefäße frei zu liegen kamen. Zur Verhinderung der Austrocknung des Gewebes erfolgte in gewissen Abständen eine erneute Spülung mit Kochsalz-Lösung. Zur Vermeidung von Blutungen wurden abgehende Gefäße in einiger Entfernung zum Hauptgefäß durchtrennt. Bei Blutungskomplikationen erfolgte die Blutstillung durch wiederholte Spülungen, durch leichte Kompression der Blutungsstelle mit einem Tupfer, oder durch Kompression des Gefäßes mit einer Pinzette proximal der Blutungsstelle. Nach fertiger Präparation wurde das Feld wieder gespült, bis alle Farb- und Gewebsreste entfernt waren.

Nach Entfernung der Klemmen wurde die zweite Kammerhälfte befestigt, und die Muttern bis zu einem leichten Widerstand angezogen und dann wieder etwas gelockert (eine halbe Umdrehung).

Vor Auflegen des Deckglases wurde ein Tropfen Natrium-Chlorid-Lösung auf das präparierte Fenster aufgebracht, ein Deckglas (Durchmesser 11,8 Millimeter) aufgelegt, die überschüssige Flüssigkeit mit einer Kompresse aufgesogen, so dass sich das Glasplättchen luftfrei auf die präparierte Haut aufgesetzt und dann mit einem Spannring fixiert werden konnte. (Menger MD 2002, Lehr HA 1993)

Bis zum vollständigen Erwachen der Tiere aus der Narkose diente den Mäusen eine Rotlichtlampe (Abstand größer als 30 Zentimeter) zum Schutz vor Auskühlung.

Um den Tieren die Möglichkeit zur postoperativen Erholung zu geben wurden in den folgenden 48 Stunden keine weiteren Maßnahmen durchgeführt.



Abb. 3: BALB/c-Maus mit fertiggestellter Rückenhautkammer

3.5 Laparotomie und Leberresektion

An den Kontrollgruppen wurde am Tag 0, 48 Stunden nach Fertigstellung der Rückenhautkammer eine mediane Laparotomie in Narkose durchgeführt.

Der Vorgang der Anästhesie und Instrumentenvorbereitung wiederholte sich nach oben beschriebener Art und Weise. Zur Bestimmung des Körpergewichts wurde vom Gesamtgewicht das Gewicht der Kammer (circa 3,2 Gramm) abgezogen. Benötigtes Instrumentarium: drei gebogene anatomische Klemmen, eine Präparierschere, eine anatomische Pinzette, eine kleine gebogene spitze Pinzette, eine kleine anatomische Pinzette, eine Mikroschere, ein Nadelhalter.

Das gesamte Abdomen, die Flanken und der distale Thorax wurden rasiert.

Die Maus wurde auf eine Korkplatte mit Aussparung für die Kammer auf dem Rücken liegend an den vier Extremitäten und dem Schwanz mit Pflaster (Leukosilk) fixiert. Für die mediane Laparotomie wurde zunächst nur die Haut mit der groben Schere ab Mitte des Abdomens bis über das Xyphoid, dann die Muskulatur mit der feinen Schere durchtrennt. Das Abdomen wurde mit mindestens 1 ml NaCl-Lösung gespült, auf Bluttrockenheit kontrolliert und danach allschichtig, fortlaufend mit Prolene 5-0 verschlossen.

An den Leberresektionsgruppen wurde am Tag 0 eine 70 prozentige Leberresektion durchgeführt.

Nach medianer Laparotomie wurde das Xyphoid mittels Durchtrennung der linken und rechten Haltebänder mobilisiert. Die Bauchdecken wurden rechts und links mit gebogenen Klemmchen, das Xyphoid mit einem Klemmchen nach kranial ausgelagert.

Bei der weiteren Präparation wurden immer feuchte Tupfer verwendet. Nach Durchtrennung des Ligamentum falciforme zwischen linkem Leberlappen und zentralem Leberlappen wurde der zentrale Leberlappen in der Mitte des Zwerchfells senkrecht positioniert. Mit Hilfe von Pinzette und Tupfer erfolgte die Anlage eines Fadens (Vicryl 5-0) um den zentralen Leberlappen. Unter Zuhilfenahme des OP-Mikroskops wurde der Faden so weit wie möglich hilusnah geknotet. Der Faden

wurde abgeschnitten und überstehendes Lebergewebe mit der Schere reseziert. Ebenso gestaltete sich das Vorgehen mit dem rechten und dem linken medialen Leberlappen. Dieses Vorgehen entspricht einer 70%-igen Leberresektion. (Higgins GM 1931)

Anschließend wurde das Abdomen mit 1 ml NaCl-Lösung gespült, auf Bluttrockenheit kontrolliert und danach allschichtig, fortlaufend mit Prolene 5-0 verschlossen.

3.6 Tumorzellimplantation

Am Tag 0 wurden die Tumorzellen in die Rückenhautkammer implantiert. (Pellet jeweils $\sim 1 \times 10^5$ Zellen). Aufgrund der Austrocknungsgefahr wurden die Tumorzellen sofort appliziert.

Zur Implantation wurde der Sprengring und das Deckgläschen vorsichtig mit einer sterilen Kanüle entfernt und das Pellet der Tumorzellen mit einer Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) auf eine vorher ausgewählte Region aufgebracht. Die Tumorzellen sollten möglichst in das obere Drittel der Kammer und nicht direkt über große Gefäße implantiert werden, da die Rückenhaut die Tendenz zeigt, sich in der Rückenhautkammer nach ventral zu bewegen.

Anschließend wurde die Kammer sofort wieder mit einem neuen Deckglas ohne Lufteinschluss bedeckt. Das Deckglas sollte von dorsal nach ventral fallen, um eine mögliche Streuung der Zellen nach dorsal zu verhindern. Es wurde ein neuer Sprengring (Sterilisation wie oben beschrieben) mit Öffnung nach 9 Uhr aufgesetzt.

Der gesamte Vorgang muß schnell erfolgen, um ein Austrocknen der Kammer zu verhindern. Kam es zu keiner Adhärenz der Kammerhaut mit dem Deckglas konnte

man mit einem Tupfer die Kammerhaut an einer vom Tumor entfernten Stelle mit dem Deckglas in Kontakt bringen. (Kollmar O 2007a)

3.7 Experimentelles Protokoll und Medikamentengabe

Die Tiere wurden in 6 Gruppen wie folgt randomisiert.

Gruppe	Operation	Mediaktion (i.p.)	Anzahl (n)
I	Laparotomie	0,01 ml PBS	8
II	Leberresektion	0,01 ml PBS	7
III	Laparotomie	0,2 ml Cyclosporin	8
IV	Leberresektion	0,2 ml Cyclosporin	6
V	Laparotomie	0,2 ml Rapamycin	7
VI	Leberresektion	0,2 ml Rapamycin	8

Die Substanzen wurden in der angegebenen Menge ab Tag der Tumorzellimplantation täglich intraperitoneal appliziert. PBS steht für Phosphate Buffered Saline. Die Dosierung der Substanzen erfolgte wie folgt: 1mg Cyclosporin/ml Olivenöl entspricht 10mg/kg KG Cyclosporin (CyA; Cyclosporin A, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 0,15mg Rapamycin/ml DMSO (20%) entspricht 1,5mg/kg KG Rapamycin (RAPA; Rapamycin (242), Wyeth Pharma, Medizinische Abteilung, Münster, Deutschland).

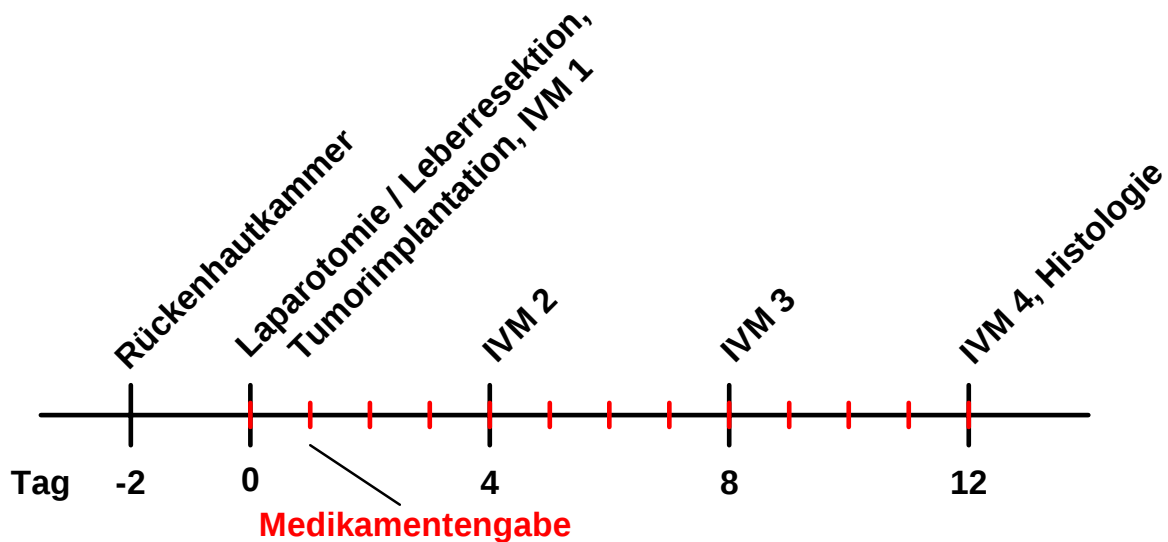


Abb 4: Zeitliche Abfolge der Operationen, Untersuchungen und Medikamentengabe

3.8 Intravitalmikroskopie (IVM)

Nach Einleitung der Anästhesie der Tiere wurden die Tiere auf eine Mikroskopierbühne gelegt und die Kammer gut mit dem Haltfaden fixiert.

Mikroskopierte wurde mit einem modifizierten Zeiss Axio-Tech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in Auflichttechnik mit einer 100Watt HBO Quecksilberlampe, einem Olympus-Objektiv (4-fache Vergrößerung, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland), sowie einem Zeiss Wasserimmersionsobjektiv mit 10-facher und 20-facher Vergrößerung unter Benutzung eines Blaulicht-Filters (450 bis 490 Nanometer Wellenlänge). Mit der 4 fachen Vergrößerung wurden ein oder zwei Felder zur Erfassung der Tumorgröße eingestellt. Mit dem 10er Objektiv wurden vier Randfelder bei 0, 3, 6 und 9 Uhr und ein bis vier Felder im Tumorzentrum zur Beurteilung der Tumorzellstreuung und Tumorzellmigration, Beurteilung von Einblutungen, der Neoangiogenese sowie zuführende und wegführende Gefäße mikroskopierte. Mit dem 20er Wasserimmersionsobjektiv wurden die Sichtfelder zur Bestimmung der Gefäßdichte,

Durchmesser, und Kapillardichte im Tumorzentrum durch einen senkrechten und einen waagerechten Durchgang erfasst (Form einer Kreuzes).

Nach einem ersten Durchgang nativ (ohne Farbstoffgabe), erfolgte ein zweiter Durchgang mit dem 20er Objektiv nach retrobulbärer Applikation von 0,04 ml FITC (Fluoresceinisothiocyanat 40mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und 0,1 ml Rodamin (1mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). FITC diente der besseren Darstellung der Gefäße (Thorball N 1981), Rodamin der Anfärbung von Leukozyten (Papadimitriou JM 1976).

Die Darstellung der mikroskopischen Bilder erfolgte durch eine an das Mikroskop gekoppelte Videokamera (FK 6990, COHU, Prospective Measurements Inc., San Diego, USA) und wurde zur späteren Analyse auf ein Video-System übertragen (VO-5800 PS, Sony, München, Deutschland) beziehungsweise auf einen DVD-Rekorder (Samsung Electronics GmbH, Schwalbach / Ts., Deutschland).

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie fand an den Tagen 0, 4, 8, und 12 nach Tumorzellimplantation statt, wobei am Tag 0 die Mikroskopie nur mit dem 4er und 10er Objektiv erfolgte, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Neoangiogenese zu erfassen war.

3.9 Auswertung der Intravitalmikroskopie

Die Auswertung der aufgenommenen IVM-Bilder erfolgte off-line durch ein Computergestütztes Bild-Analyse-System (CapImage, Zeintl Software; Heidelberg, Deutschland). Die Fluoreszenz der Tumorzellen erlaubte eine präzise Abgrenzung des Tumors von dem umgebenden Kammergewebe. Außerdem ermöglichte sie die Identifizierung einzelner Zellen zur Bestimmung der Zellmigration. Zu jedem

Beobachtungszeitpunkt wurden als erstes die Tumorgroße (Fläche in Quadratmillimetern) und der Tumordurchmesser (jeweils vier Messungen: senkrecht, waagrecht, 45°, minus 45° durch den Tumor) bestimmt.

Die mit dem 10er Objektiv aufgenommenen Bilder wurden hinsichtlich Neoangiogenese, Blutung und Zellmigration, sowie Durchmesser und Länge zu- und wegführender Gefäße (in Mikrometern, bzw. Zentimetern pro Quadratzentimeter (Länge pro Gesichtsfeld)) beurteilt. Angiogenese wurde definiert als das Auftreten und die Ausbildung von Gefäßröhren aus vorbestehenden Gefäßen. Die Zahlen Null und Eins beschrieben das Fehlen, bzw. Vorhandensein von Angiogenese in dem entsprechenden Feld. Die gleiche Nomenklatur diente zur Beurteilung einer vorhandenen Zellmigration. Das Auftreten einer Blutung wurde wie folgt klassifiziert: 0 für keine Blutung, 1 für Blutung in 30 %, 2 für 60 % des Tumorareals, 3 für 100 % im untersuchten Tumorareal.

Als Neovaskularisation wurde die Ausbildung der Gefäßröhren zu funktionstüchtigen Gefäßen unter Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes mit definiert. Dazu wurden die kreuzförmig im Tumor angeordneten Bilder ausgewertet (20er Objektiv). Die Neovaskularisierung wurde als Gefäßdichte (Länge / Gesichtsfeld) bestimmt. Desweiteren erfolgte pro Gesichtsfeld die Bestimmung von Durchmesser (μm) und Flussgeschwindigkeit (cm/sec) von fünf Kapillaren. Daran schloss sich die Auswertung der Bilder nach Farbstoffgabe (FITC und Rhodamin) an. Es folgte die erneute Auswertung der oben beschriebenen Parameter in oben beschriebener Art und Weise. Zur Zählung der Leukozyten pro Sichtfeld wurden die Aufnahmen mit dem 560nm-Filter genutzt. Als adhärenente Leukozyten wurden solche klassifiziert, die mindestens 20 Sekunden an der Gefäßwand adhärent waren (Angabe in Anzahl / Gesichtsfeld).

3.10 Histologie und Immunhistochemie

Nach der letzten Mikroskopie (12.Tag) wurden die Tiere mittels einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland) euthanasiert. Nach dem Tod der Tiere und nach Abbau der Kammer, wurde die Kammerhaut mit dem Tumor aus dem Hautlappen herauspräpariert und mit mehreren Kanülen auf einem kleinen Stück Kork fixiert, um ein Aufrollen des Gewebes zu verhindern. Nach Teilung des Tumors erfolgte die Fixierung der einen Hälfte in einer 4 %-igen Formalinlösung und der anderen Hälfte in flüssigen Stickstoff. Aus dem flüssigen Stickstoff genommen wurden die Nadeln durch drehen entfernt und das Gewebestück in Tissue-Tek-Lösung (Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland) eingebettet und bei -70°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Zur Bestimmung des Gesamtlebergewichtes wurde bei allen Tieren am 12. Tag nach Tumorimplantation die komplette Leber entnommen.

Für die lichtmikroskopischen Analysen wurden die Formalin-fixierten Proben in Paraffin eingebettet. Schnitte von fünf Mikrometer Dicke wurden angefertigt und standard-mäßig mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte entparaffiniert und anschließend 10 Minuten in Hämatoxylinlösung gefärbt. Nach Abwaschen der Lösung mit Wasser wurden die Schnitte mit Salzsäure differenziert. Es folgte ein Bläuen im warmen Wasser für 4 Minuten. Als nächster Schritt folgte die Färbung in Eosinlösung für 4 Minuten, das Entwässern und abschließendes Eindecken der Schnitte.

Zur Untersuchung von Zellproliferation und apoptotischem Zelltod, wurden die Präparate mit Hilfe indirekter Immunperoxidasetechniken mit Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) und Caspase-3 gefärbt. Dafür wurden deparaffinierte Schnitte in 3% Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und 2% Ziegen-Normalserum, um

endogene Peroxidasen und unspezifische Bindungen zu blocken, inkubiert. Ein monoklonaler Maus - PCNA Antikörper (PC10, 1:50; DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) und ein polyklonaler Hase-anti-Maus Caspase-3 Antikörper (Asp175, 1:50; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) wurden als primäre Antikörper benutzt. Der Caspase-3 Antikörper detektiert das kurze Fragment (17/19 kD) der aktivierten Caspase-3, aber nicht die komplette Länge von Caspase-3. Ziege-anti-Maus bzw. Ziege-anti-Hase Ig-Antikörper wurden als sekundäre Antikörper für die Streptavidin-Biotin-Komplex Peroxidase-Färbung verwendet (1:200, LSAB 2 System HRP, DakoCytomation). 3,3' Diaminobenzidin (DakoCytomation) wurde als Chromogen benutzt. Die Schnitte wurden mit Hemalaun gegengefärbt und unter dem Lichtmikroskop beurteilt.

3.11 Statistische Auswertung

Alle Werte werden in der Arbeit als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. Nach Bestätigung der Annahme von Normalverteilung und Homogenität in den Gruppen wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mittels ANOVA errechnet und anschließend mittels post-hoc Test mit Korrektur des alpha-Fehlers gegeneinander verglichen. Statistische Signifikanz wurde mit p kleiner 0,05 festgelegt. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der SigmaStat-Software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Tumorwachstum unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung

Rapamycin hemmte signifikant das Tumorwachstum. Innerhalb der 12-tägigen Wachstumsphase ergab sich bei den Tieren ein mittlerer Größenzuwachs der Tumorfläche von $4,38 \pm 0,44 \text{ mm}^2$ zur Ausgangsfläche bei den sham-behandelten Tumoren, von $3,28 \pm 0,30 \text{ mm}^2$ bei den mit Cyclosporin behandelten und von $1,45 \pm 0,16 \text{ mm}^2$ bei den mit Rapamycin behandelten Tumoren. Was bei den Mäusen, die mit Cyclosporin behandelt wurden einem signifikanten Größenunterschied am 12. Tag und bei denen, die Rapamycin erhielten, einem signifikanten Unterschied am 8. und 12. Tag gegenüber der Kontrollgruppe entspricht (siehe Abb. 5).

Die Cyclosporin-Therapie verursachte so ebenfalls einen hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum, wenn auch nicht in dem Maße wie die Therapie mit Rapamycin.

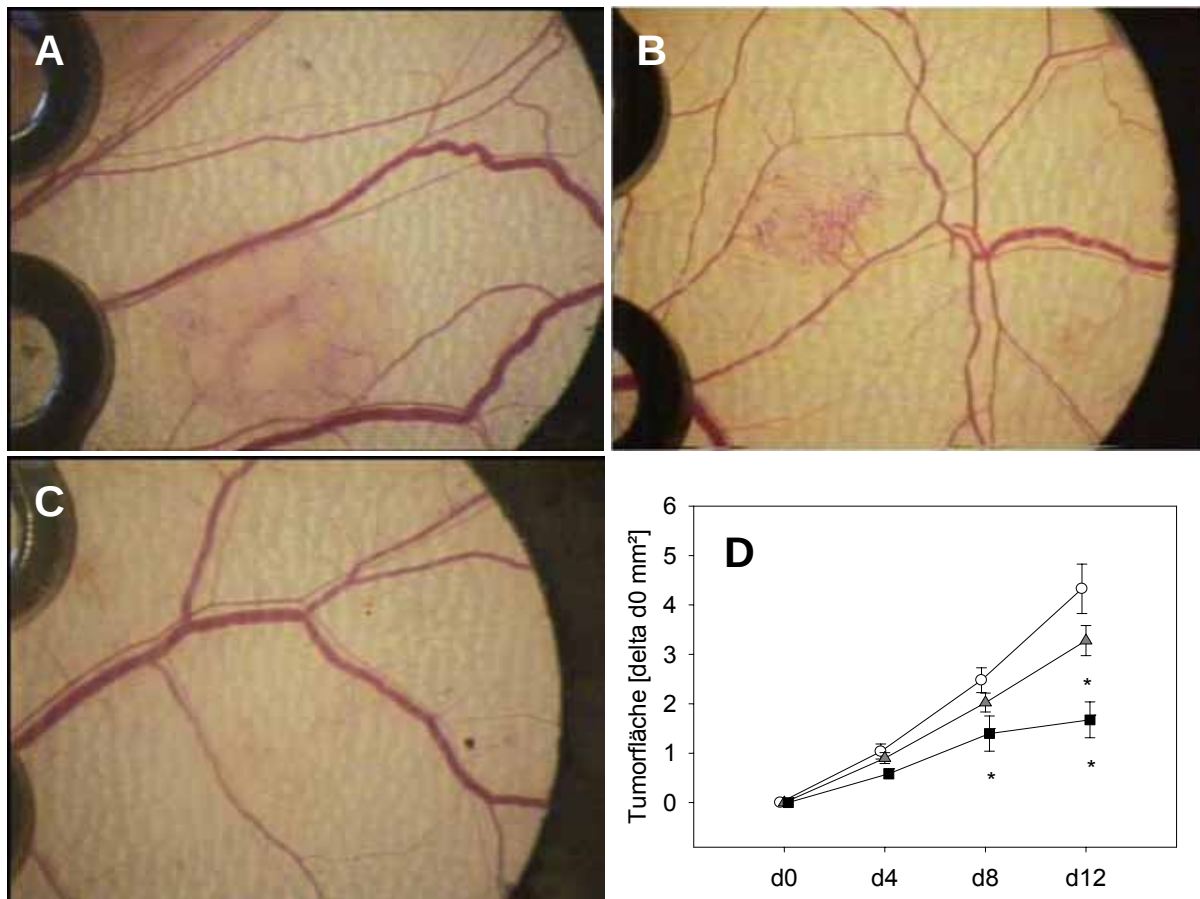


Abb. 5: OP-mikroskopische Darstellung der Tumoren am 12. Tag nach Implantation. A Kontrolle mit PBS (weiße Kreise), B Behandlung mit Cyclosporin (graue Dreiecke), C Behandlung mit Rapamycin (schwarze Vierecke). D Graphische Darstellung der Entwicklung der Flächenzunahme (* = signifikant zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$)).

4.2 Tumorangiogenese unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung

Das Einsetzen der Tumorangiogenese, definiert als das erste Erscheinen neuer Gefäßäste und -röhren, unterschied sich nicht signifikant zwischen den drei Gruppen. Während nur einige wenige neu gebildete Gefäße in den Tumoren vier Tage nach Tumorzellimplantation zu beobachten waren, waren die Tumormassen am Ende des Beobachtungszeitraums mit Kapillaren übersät (siehe Abb. 6).

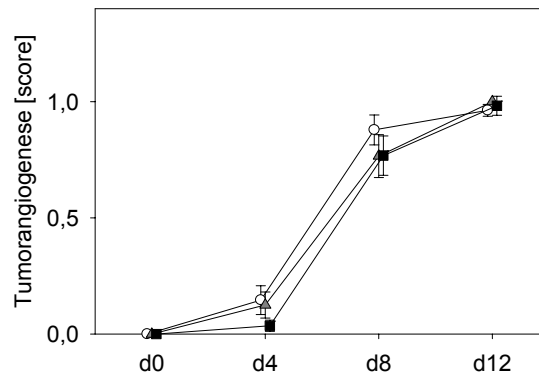


Abb. 6: Tumorangiogenese bis zum 12. Tag als Mittelwert aller untersuchten Felder. Score: 0 = keine Angiogenese im untersuchten Feld, 1 = Angiogenese vorhanden (Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke)

Die Behandlung mit Rapamycin verminderte signifikant die Neovaskularisation kolorektaler Metastasen. Rapamycin verminderte signifikant die funktionelle Kapillardichte im Vergleich zu den Kontrollen. Während die Kapillardichte im Bereich des Tumorrandes der Kontrolltiere ständig zunahm und $130,23 \pm 22 \text{ cm/cm}^2$ am Tag 8 und $164,8 \pm 18,56 \text{ cm/cm}^2$ am Tag 12 erreichte, zeigte sich bei den mit Rapamycin behandelten Tieren eine Kapillardichte von nur $20,33 \pm 4,7 \text{ cm/cm}^2$ am Tag 8 und von $76,29 \pm 15,16 \text{ cm/cm}^2$ am Tag 12. Vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Neovaskularisation bei Rapamycin-Gabe waren im Tumorzentrum mit Kapillardichten von $17,11 \pm 3,85 \text{ cm/cm}^2$ an Tag 8 und $65,85 \pm 15,22 \text{ cm/cm}^2$ an Tag 12 zu beobachten. Die Ergebnisse waren signifikant unterschiedlich verglichen mit der Kontrolle und den mit Cyclosporin behandelten Tumoren (siehe Abb. 7). Der Vergleich der Cyclosporin- mit der Kontrollgruppe erbrachte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Kapillardichte.

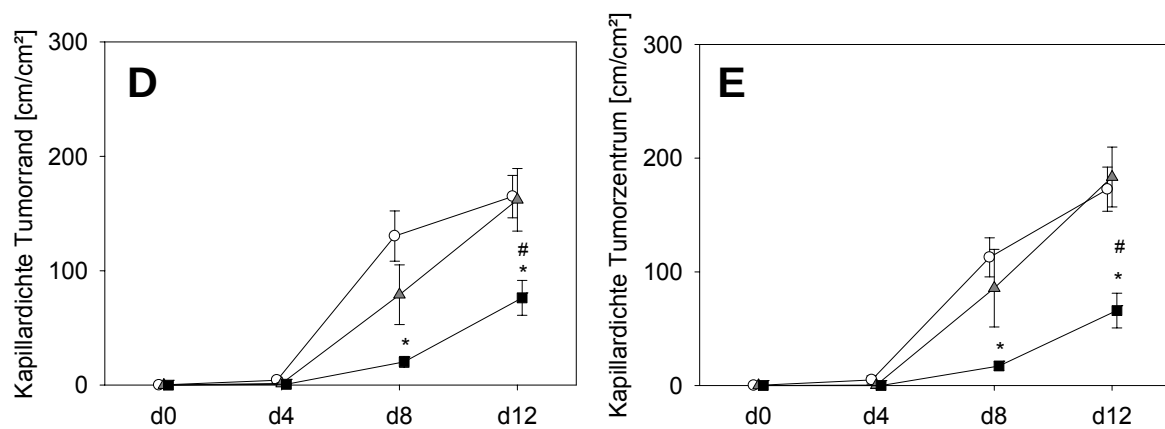
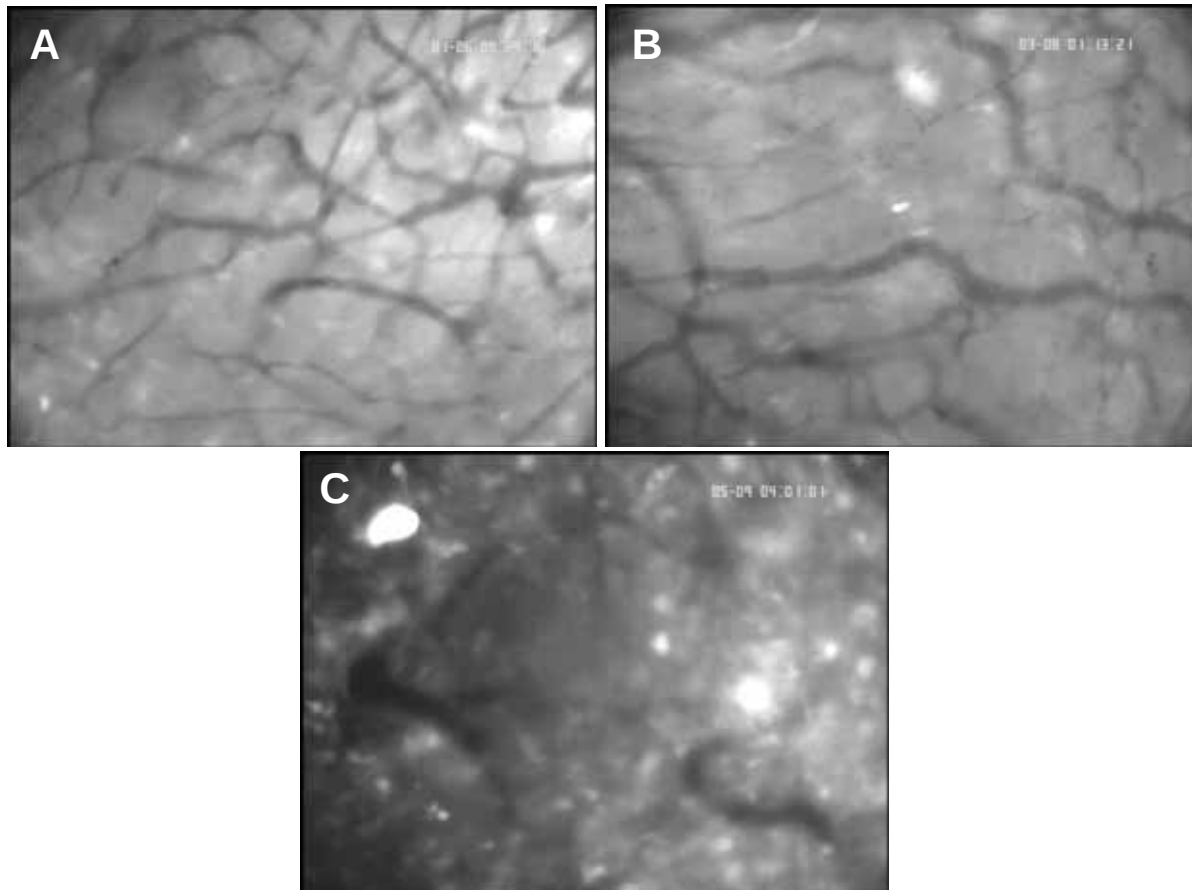


Abb. 7: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Kapillardichte im Tumorzentrum der Kontrollgruppe (A), nach Behandlung mit Cyclosporin (B) und nach Behandlung mit Rapamycin (C) am Tag 12 nach Tumorzellimplantation. Entwicklung der funktionellen Kapillardichte im Bereich des Tumorrandes (D) und im Tumorzentrum (E), Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. Cyclosporin)

Rapamycin reduzierte signifikant die Geschwindigkeit der Erythrozyten in den Kapillaren. In den Kontrolltumoren ergab sich in den neu geformten Gefäßen im Tumorrand eine Geschwindigkeit der roten Blutzellen von $0,12 \pm 0,05$ cm/s am 4. Tag, die danach auf ein Plateau von $0,08 \pm 0,004$ cm/s am 8. Tag und $0,08 \pm 0,01$ cm/s am 12. Tag abfiel (siehe Abb. 8 A).

Die Geschwindigkeit der roten Blutzellen im Tumorzentrum lag am 4. Tag mit $0,05 \pm 0,05$ cm/s deutlich, am 8. Tag mit $0,07 \pm 0,01$ cm/s und am 12. Tag mit $0,06 \pm 0,01$ cm/s leicht unter der des Tumorrandes (siehe Abb. 8 B). Unter Behandlung mit Cyclosporin zeigte sich im Tumorrand am 4. Tag eine Geschwindigkeit der roten Blutzellen von $0,04 \pm 0,03$ cm/s und eine komplette Stase des Blutflusses bei Rapamycingabe, wobei die Unterschiede an diesem Tag aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant waren. Auch im Zentrum des Tumors zeigte sich eine komplette Stase des Blutflusses, sowohl bei den mit Rapamycin, als auch bei den mit Cyclosporin behandelten Tumoren. Obwohl bis zum 12. Tag ein Angleichen der Flussgeschwindigkeiten aller Gruppen auf 0,07 cm/s im Bereich des Tumorrandes und auf 0,06 cm/s im Bereich des Tumorzentrums zu verzeichnen war, so blieben die Geschwindigkeiten in den mit Cyclosporin und Rapamycin behandelten Tumoren am 8. Tag signifikant unter denen der Kontrollgruppe, mit Tiefstwerten in der Rapamycingruppe von $0,01 \pm 0,003$ cm/s im Randgebiet des Tumors ($p < 0,05$ vs. Kontrolle und Cyclosporin A) und $0,01 \pm 0,009$ cm/s im Zentrum (Abb 8).

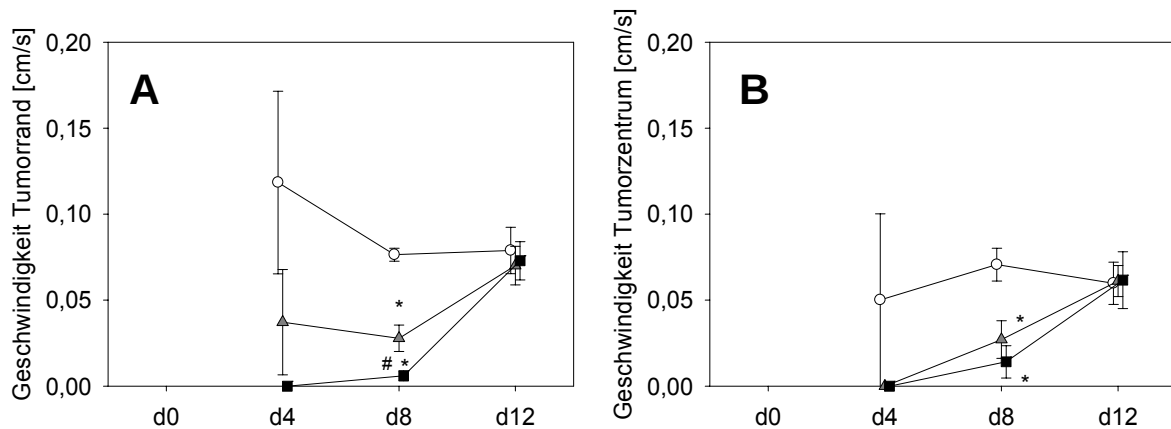


Abb. 8: Flußgeschwindigkeit der roten Blutzellen innerhalb des Beobachtungszeitraums im Bereich des Tumorrandes (A) und des Tumorzentrums (B), Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. Cyclosporin)

Der Kapillardurchmesser von Tumorgefäßen wurde durch Rapamycin und Cyclosporin nicht beeinflusst. Die Durchmesser der neu geformten Kapillaren lagen im Bereich von $9,87 \pm 0,41 \mu\text{m}$ am Rande des Tumors und $10,24 \pm 0,63 \mu\text{m}$ im Tumorzentrum während des gesamten Beobachtungszeitraums. Unter Behandlung mit Cyclosporin oder Rapamycin unterschieden sich die Durchmesser mit $10,91 \pm 1,12 \mu\text{m}$ (Tumorrand) und $10,64 \pm 0,78 \mu\text{m}$ (Tumorzentrum) nach Cyclosporin Gabe und $10,66 \pm 0,71 \mu\text{m}$ (Tumorrand) und $11,19 \pm 0,66 \mu\text{m}$ (Tumorzentrum) nach Rapamycin Gabe nicht von denen der Kontrolltumoren (siehe Abb. 9).

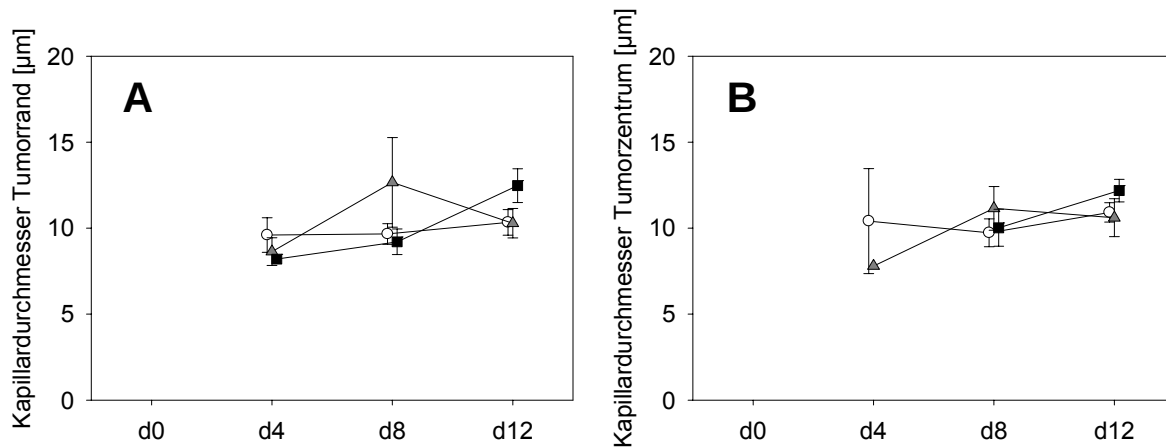


Abb. 9: Darstellung des Gefäßdurchmessers im Bereich des Tumorrandes (A) und im Tumorzentrum (B), Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke.

Rapamycin reduzierte die petechialen Einblutungen in den Tumoren. Petechiale Blutungen in angiogenetischen Bereichen wachsender Tumoren sind ein charakteristischer Indikator für „unreife Gefäße“ mit einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit. Aus diesem Grund wurde das Auftreten petechialer Blutungen in den Beobachtungsfeldern mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Innerhalb des Beobachtungszeitraums zeigte sich im Randbereich des Tumors unter Behandlung mit Rapamycin die geringste Tendenz für Einblutungen (siehe Abb. 10). Bei der Kontroll- und der Cyclosporingruppe wurden bis zum 8. Tag nach Tumorimplantation vergleichbare Einblutungen beobachtet, danach kam es zu einem starken Abfall der Inzidenz bis zum 12. Tag bei den Cyclosporintieren. Die Untersuchung des Tumorzentrums hinsichtlich petechialer Blutungen erbrachte ein vergleichbares Bild mit einem Maximum in der Kontroll- und Cyclosporingruppe um den 8. Tag. Insgesamt betrachtet war allerdings aufgrund der hohen Standardabweichungen keiner der beschriebenen Unterschiede statistisch signifikant.

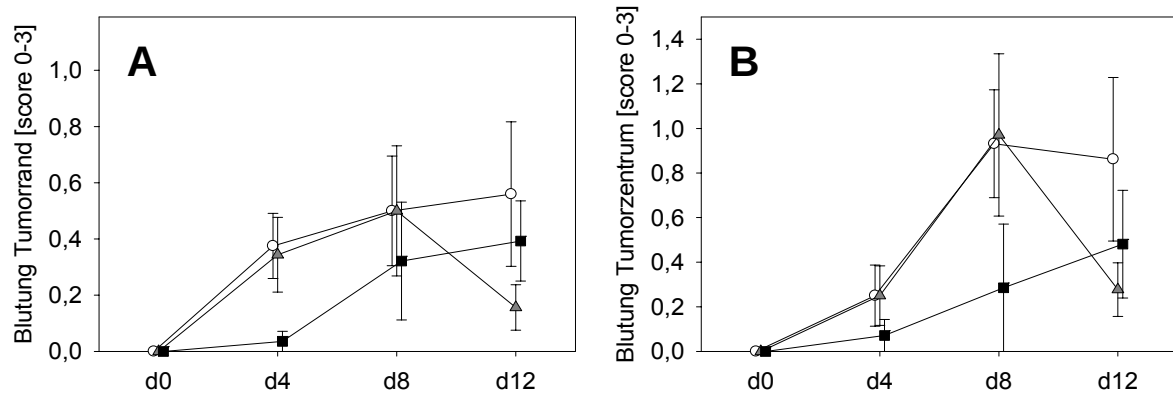


Abb. 10: Petechiale Einblutungen in den Tumoren als Mittelwert aller untersuchten Felder. Score der Blutung im Bereich des Tumorrandes (A) und im Tumorzentrum (B), Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke.

4.3 Leukozytenadhäsion unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung

Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurde die Leukozytenadhäsion in den Kapillaren der wachsenden Tumoren untersucht. Die Behandlung mit Rapamycin und Cyclosporin reduzierte die Leukozytenadhäsion in den Tumoren, am ausgeprägtesten nach Behandlung mit Rapamycin (siehe Abb. 11). Es fanden sich am 8. und am 12. Tag 7 ± 1 Leukozyten pro Feld im Tumorrand und 6 ± 1 pro Feld im Tumorzentrum bei den Kontrolltieren. Die Behandlung mit Cyclosporin führte zu einer Verminderung der Leukozytenadhäsion auf 3 ± 1 (Tumorrand) und 2 ± 1 (Tumorzentrum) Leukozyten pro untersuchtem Feld am 8. Tag, am 12. Tag fanden sich 5 ± 1 Leukozyten pro Feld eine leicht verringerte Anzahl im Tumorrand im Vergleich zur Kontrollgruppe und mit 6 ± 1 Leukozyten pro Feld eine zu den Kontrollen vergleichbare Anzahl im Tumorzentrum. Rapamycin bewirkte eine starke Reduzierung der Leukozytenadhäsion, so dass nur noch einzelne Leukozyten am 8. Und 12. Tag dem Endothelium der Tumorgefäße anhafteten, wobei sich signifikante Unterschiede zu den Kontrollen am 8. Tag sowohl im Tumorrand, als auch im

Tumorzentrum zeigten. Da die Kapillardichte in den Tumoren der mit Rapamycin behandelten Tiere sehr gering war (siehe 4.2), wurde zusätzlich die Anzahl adhärenter Leukozyten pro mm Gefäßlänge ausgewertet. Diese Auswertung zeigte, dass allein Rapamycin am Tag 8 die Anzahl adhärenter Leukozyten im Vergleich zur Kontrolle reduzierte (siehe Abb. 11).

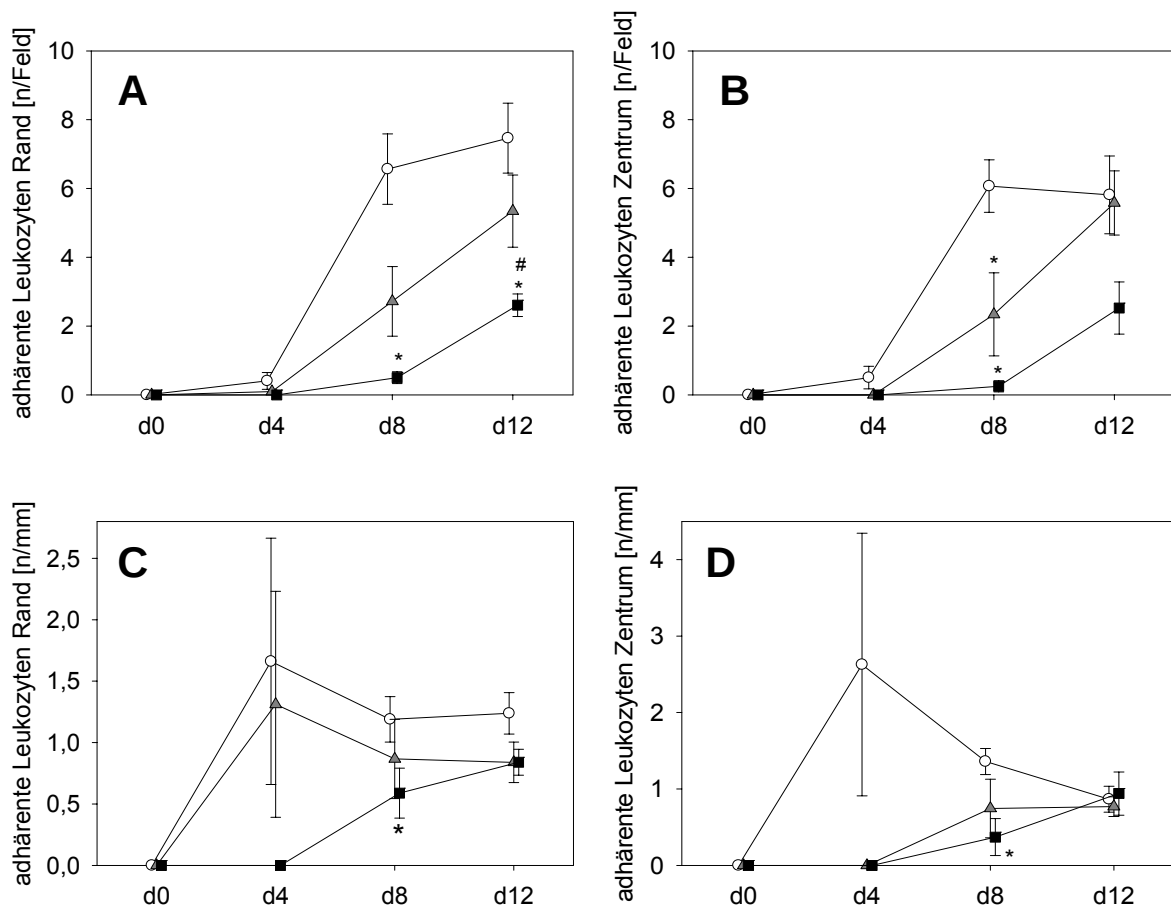


Abb. 11: Anzahl adhärenter Leukozyten pro Beobachtungsfeld im Tumorrand (A) und im Tumorzentrum (B) und Anzahl adhärenter Leukozyten pro mm Gefäßlänge im Tumorrand (C) und im Tumorzentrum (D), Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. Cyclosporin)

4.4 Tumorzellproliferation und –apoptose unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung

Die Tumorzellproliferation wurde durch immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker PCNA 12 Tage nach Tumorzellimplantation bestimmt. In den Kontrolltumoren waren $39,1 \pm 3,1\%$ der Tumorzellen PCNA positiv. Die Behandlung mit Cyclosporin zeigte mit $30,7 \pm 4,2\%$ eine leicht verminderte Anzahl PCNA positiver Zellen, die Behandlung mit Rapamycin eine mit $37,9 \pm 4,9\%$ vergleichbare Anzahl an PCNA positiver zur Kontrollgruppe, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei der immunhistochemischen Färbung mit Caspase-3, zur Bestimmung des apoptotischen Zelltodes, wurden am 12. Tag nur einzelne positive Tumorzellen ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden.

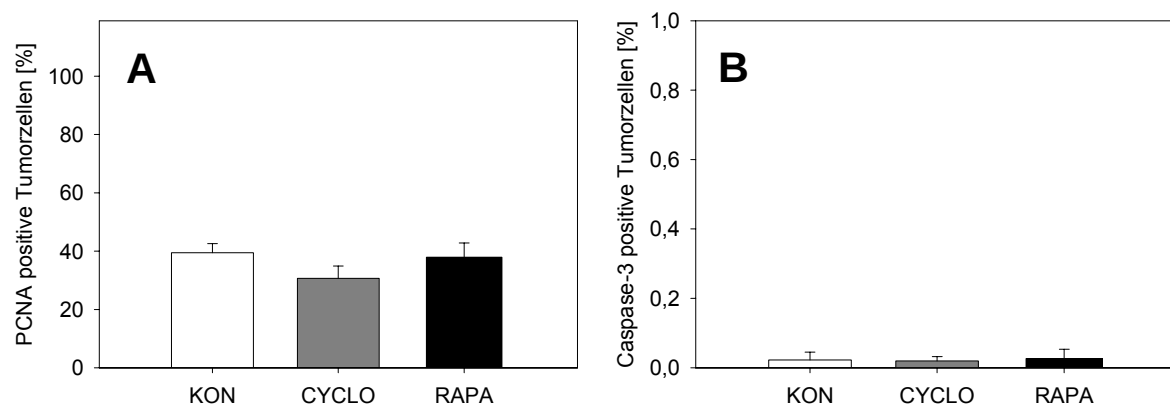


Abb. 12: Auswertung von Tumorzellproliferation (A; PCNA-Färbung) und –apoptose (B; Caspase-3-Färbung) 12 Tage nach Tumorzellimplantation unter Rapamycin (RAPA) und Cyclosporin (CYCLO) Behandlung. PBS-behandelte Tiere (KON) dienen der Kontrolle.

4.5 Mortalität nach Leberresektion

Die Behandlung mit Cyclosporin nach erweiterter Leberresektion war mit einer hohen Mortalität assoziiert. Die Kontroll- (n=7), und die mit Rapamycin behandelten Tiere (n=8) erholten sich komplikationslos nach Implantation der Rückenhautkammer und 70%iger Leberresektion. Die Tiere tolerierten die operativen Prozeduren und die täglichen Applikationen ohne Veränderungen im Schlaf- oder Fressverhalten. Im Gegensatz dazu starben 8 von 14 der mit Cyclosporin behandelten Tiere zwischen dem 7. und 12. Tag nach Leberresektion. Dieser Umstand war nicht operativen Komplikationen zuzuschreiben.

4.2.2 Leberregeneration unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung

Am 12. Tag nach der Tumorimplantation wurde bei allen Tieren die Leber entnommen. Zum Vergleich wurde das Feuchtgewicht der Leber der nicht-resezierten Tiere herangezogen, welches $1,05 \pm 0,05$ g betrug. Zwölf Tage nach Leberresektion lag das Feuchtgewicht der Leber bei den unbehandelten Tieren minimal unter dem Gewicht der nicht-resezierten Tiere ($0,96 \pm 0,03$ g). Die Behandlung mit Cyclosporin führte zu einer leichten, aber nicht signifikanten Abnahme des Lebergewichts ($0,93 \pm 0,05$ g) im Vergleich zu den nicht-resezierten Tieren und den unbehandelten leberresezierten Tieren. Die Leber der mit Rapamycin behandelten Tiere erreichte am 12. Tag mit $1,01 \pm 0,04$ g ebenfalls das Gewicht der nicht-resezierten Tiere.

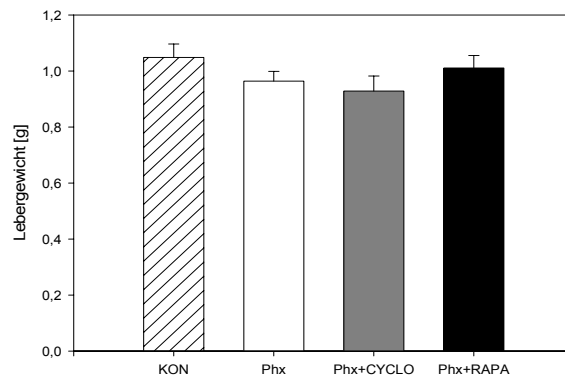


Abb. 13: Lebergewicht am 12. Tag nach Leberresektion. KON = nicht-resezierte mit PBS behandelte Kontrolltiere, Phx = leberresezierte sham behandelte Tiere, Phx+CYCLO = leberresezierte mit Cyclosporin behandelte Tiere, Phx+RAPA = leberresezierte mit Rapamycin behandelte Tiere

4.7 Tumorwachstum nach Leberresektion

Nach 70%iger Leberresektion und Tumorimplantation in die Rückenhautkammer konnte während des gesamten Beobachtungszeitraums ein zunehmendes Tumorwachstum in allen Tieren beobachtet werden. Die Behandlung mit Rapamycin hemmte drastisch das Tumorwachstum, was sich durch eine signifikante Verzögerung der Tumorflächenzunahme im Vergleich zu den Tumoren unter Behandlung mit Cyclosporin und den Kontrolltumoren zeigte ($p < 0,05$; siehe Abb. 14). Interessanterweise zeigte sich auch hier, wie bei den nicht-resezierten Tieren, eine leichte, wenn auch im Vergleich zu den Kontrolltumoren, nicht signifikante Verminderung des Tumorwachstums durch Cyclosporin.

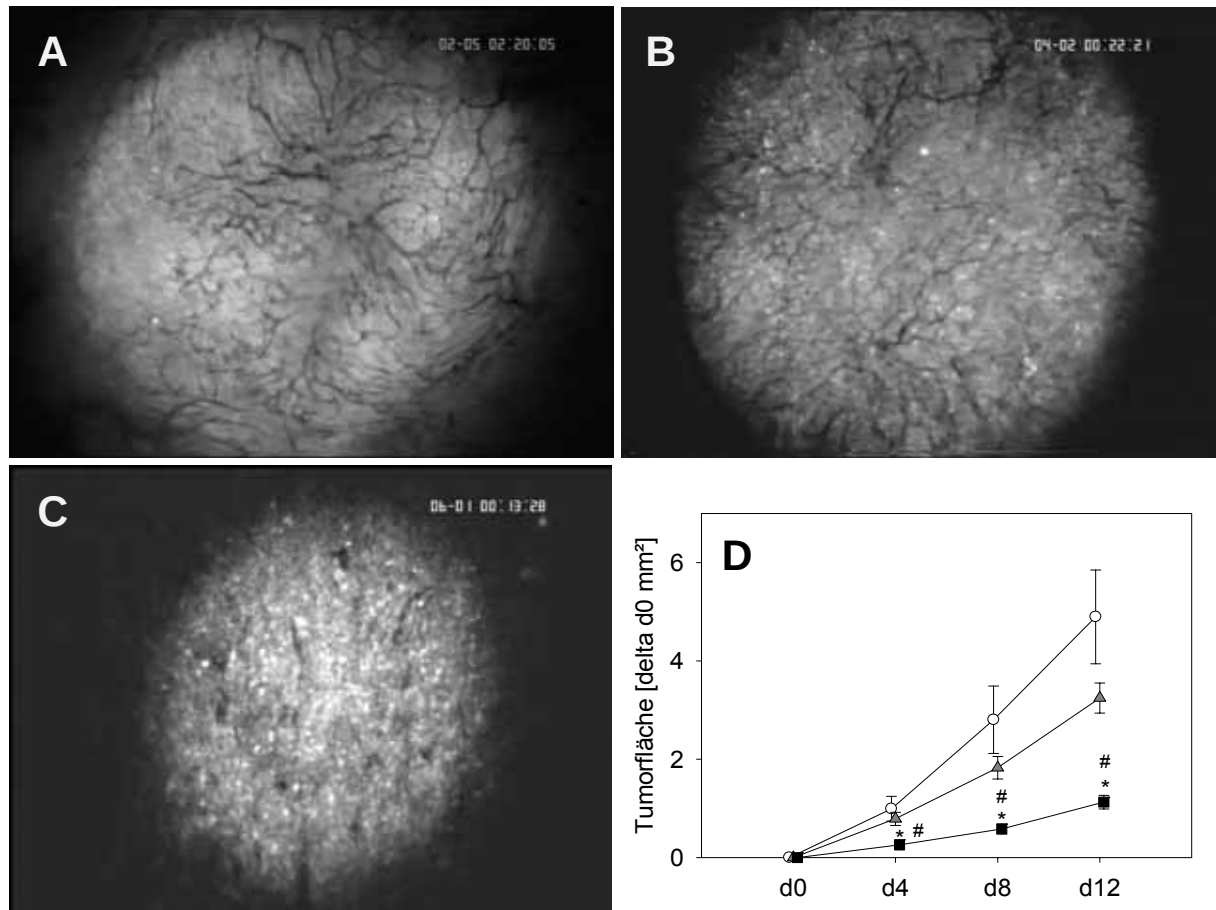


Abb. 14: Intravitalmikroskopische Darstellung der Tumoren am 12. Tag nach Tumorzellimplantation von Kontrolltieren (A), nach Behandlung mit Cyclosporin (B) und nach Behandlung mit Rapamycin (C). Die statistische Auswertung des Zuwachses der Tumorfläche innerhalb des Beobachtungszeitraums (D) zeigt die signifikante Hemmung des Tumorwachstums unter Rapamycinbehandlung. Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. Cyclosporin)

4.8 Angiogenese nach Leberresektion

Nach Leberresektion unterschied sich der Zeitpunkt des Eintretens der Tumorangiogenese nicht wesentlich zwischen den Gruppen. Es zeigten sich am 4. Tag nach Tumorimplantation und Leberresektion nur einzelne neu gebildete Blutgefäße und von chaotisch angeordneten Gefäßen übersäte Tumore am 12. Tag (siehe Abb. 15).

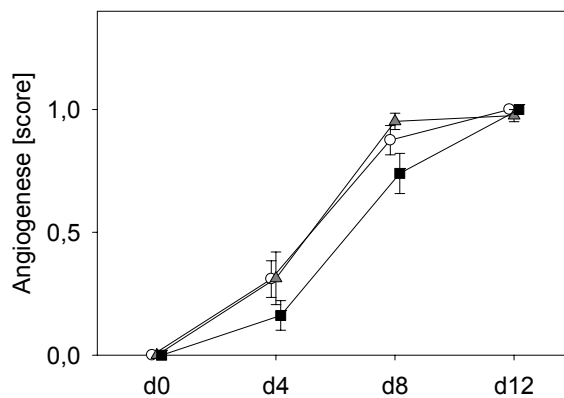


Abb. 15: Tumorangiogenese bis zum 12. Tag als Mittelwert aller beobachteten Felder. Score: 0 = keine Angiogenese im untersuchten Feld, 1 = Angiogenese vorhanden. Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke.

Rapamycin verminderte nach Leberresektion signifikant die funktionelle Kapillardichte in den Tumoren im Vergleich zu den Kontrollen (siehe Abb. 16). Die Kapillardichte im Bereich des Tumorrandes der Kontrolltiere nahm kontinuierlich zu. Am 8. Tag erreichte sie einen Wert von $133,9 \pm 35,6 \text{ cm/cm}^2$ und $221,2 \pm 23,3 \text{ cm/cm}^2$ am Tag 12. Die Tumore, der mit Rapamycin behandelten Tiere, zeigten eine signifikant zur Kontrolle verminderte Kapillardichte von nur $25,0 \pm 7,8 \text{ cm/cm}^2$ am 8. Tag und eine Kapillardichte von $68,7 \pm 9,5 \text{ cm/cm}^2$ am 12. Tag. Vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Gefäßneubildung nach Rapamycinbehandlung wurden im Tumorzentrum mit Kapillardichten, die Werte von $29,4 \pm 10,3 \text{ cm/cm}^2$ am 8. Tag und $75,9 \pm 16,0 \text{ cm/cm}^2$ am 12. Tag erreichten ($p < 0,05$ gegenüber Kontrollen und mit Cyclosporin behandelten Tumoren), beobachtet. Interessanterweise hemmte auch Cyclosporin die Gefäßneubildung im Tumor mit einer signifikant verminderten Gefäßdichte im Bereich des Tumorrandes von $132,4 \pm 39,6 \text{ cm/cm}^2$ am 12. Tag im Vergleich zu den Kontrollen ($p < 0,05$). Die Verminderung der Gefäßneubildung durch Cyclosporin war im Tumorzentrum weniger ausgeprägt und zeigte keine signifikanten Änderungen gegenüber den Kontrollen (siehe Abb. 16).

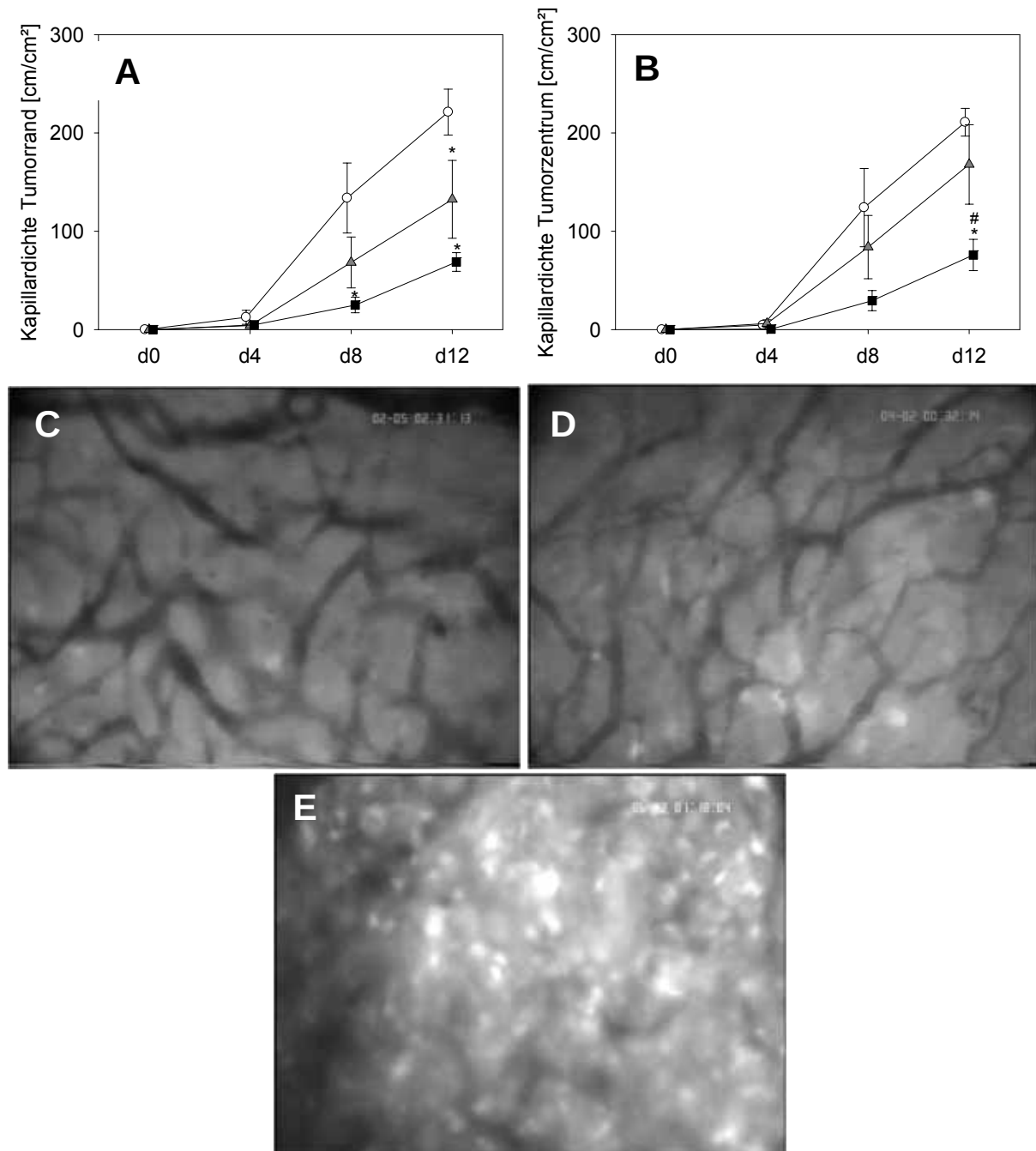


Abb. 16: Entwicklung der funktionellen Kapillardichte im Bereich des Tumorrandes (A) und im Tumorzentrum (B), Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. Cyclosporin). Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Kapillardichte im Tumorzentrum der Kontrollgruppe (C), nach Behandlung mit Cyclosporin (D) und nach Behandlung mit Rapamycin (E) am Tag 12 nach Tumorzellimplantation.

In den Tumoren der Kontrolltiere änderte sich die Blutflußgeschwindigkeit in den neu gebildeten Kapillaren im Tumorrand während des gesamten Beobachtungszeitraums, mit Werten zwischen $0,11 \pm 0,06$ cm/s am 4. Tag, $0,08 \pm 0,02$ cm/s am 8. Tag und

0,09 ± 0,02 cm/s am Tag 12 nicht signifikant (siehe Abb. 17). Verglichen mit dem Tumorrand, war die Geschwindigkeit der roten Blutzellen in den kleinen Gefäßen des Tumorzentrums mit 0,06 ± 0,03 cm/s am 4. Tag, 0,06 ± 0,01 cm/s am 8. Tag und 0,08 ± 0,02 cm/s am 12. Tag leicht vermindert. Cyclosporin und Rapamycin bewirkten einen fast kompletten Stillstand des Blutflusses in den wenigen am 4. Tag sichtbaren Kapillaren des Tumorrandes und –zentrums. Obwohl die Blutgeschwindigkeit während des Beobachtungszeitraums in diesen beiden Gruppen permanent zunahm, blieb sie jedoch unter denjenigen in den Kontrollen zurück. Interessanterweise wurde die niedrigste Flußgeschwindigkeit in der mit Rapamycin behandelten Gruppe beobachtet, in der die Geschwindigkeit nur Werte von 0,01 ± 0,00 cm/s am 8. Tag ($p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe) und 0,02 ± 0,01 cm/s am 12. Tag ($p < 0,05$ gegenüber Kontroll- und Cyclosporingruppe) im Tumorrandgebiet erreichte. Die Werte, die im Tumorzentrum ermittelt wurden, waren mit diesen vergleichbar.

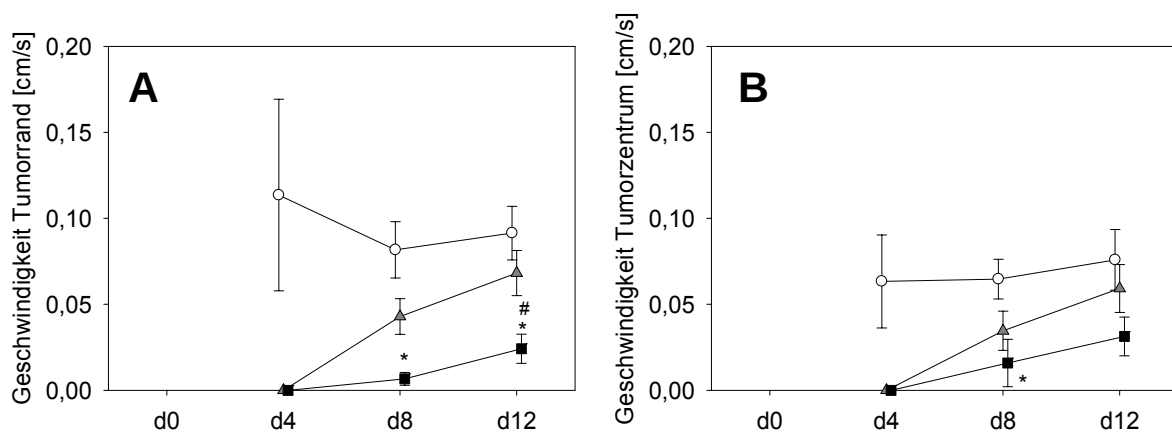


Abb. 17: Flußgeschwindigkeit der roten Blutzellen innerhalb des Beobachtungszeitraums im Bereich des Tumorrandes (A) und des Tumorzentrums (B), Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. Cyclosporin)

Die Durchmesser der Tumorkapillaren der leber-resezierten Kontrolltiere lagen während des gesamten Beobachtungszeitraums bei $10,02 \pm 0,51 \mu\text{m}$ im Tumorrand und bei $9,94 \pm 0,42 \mu\text{m}$ im Tumorzentrum (siehe Abb. 18). Nach Behandlung mit Cyclosporin oder Rapamycin unterschieden sich die Durchmesser nicht signifikant von den Kontrollen. Für die Gefäßdurchmesser wurden Werte von $11,11 \pm 0,68 \mu\text{m}$ im Tumorrand und $11,99 \pm 1,00 \mu\text{m}$ im Tumorzentrum unter Behandlung mit Cyclosporin und $10,09 \pm 0,93 \mu\text{m}$ im Tumorrand und $10,38 \pm 0,93 \mu\text{m}$ im Tumorzentrum unter Behandlung mit Rapamycin gemessen.

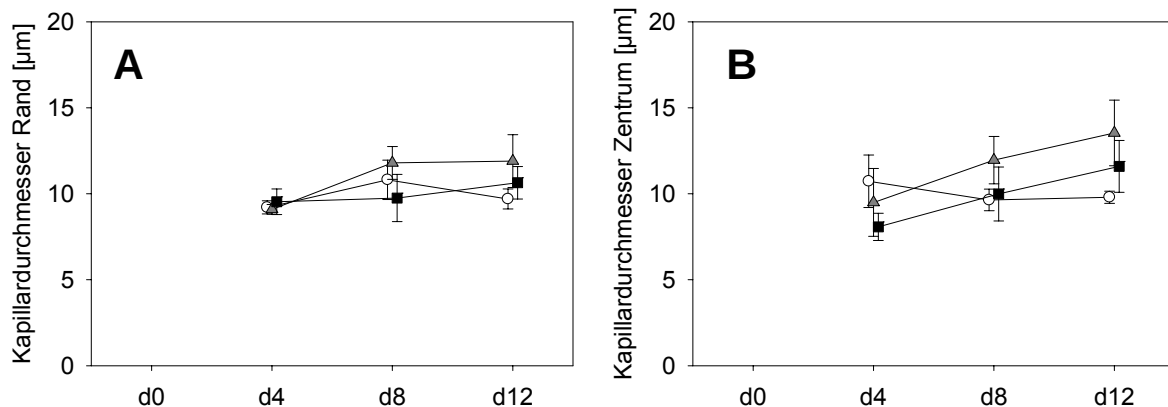


Abb. 18: Darstellung des Gefäßdurchmessers im Bereich des Tumorrandes (A) und im Tumorzentrum (B), Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke.

Nach Leberresektion reduzierten Rapamycin und Cyclosporin petechiale Einblutungen in den Tumoren. Die Blutungsintensität aller Gruppen erreichte ein Maximum um den 8. Tag nach Tumorzellimplantation und Leberresektion. Interessanterweise zeigte sich die Blutungstendenz am stärksten in der Kontrollgruppe. Aufgrund der hohen Standardabweichungen in den einzelnen Gruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb 19).

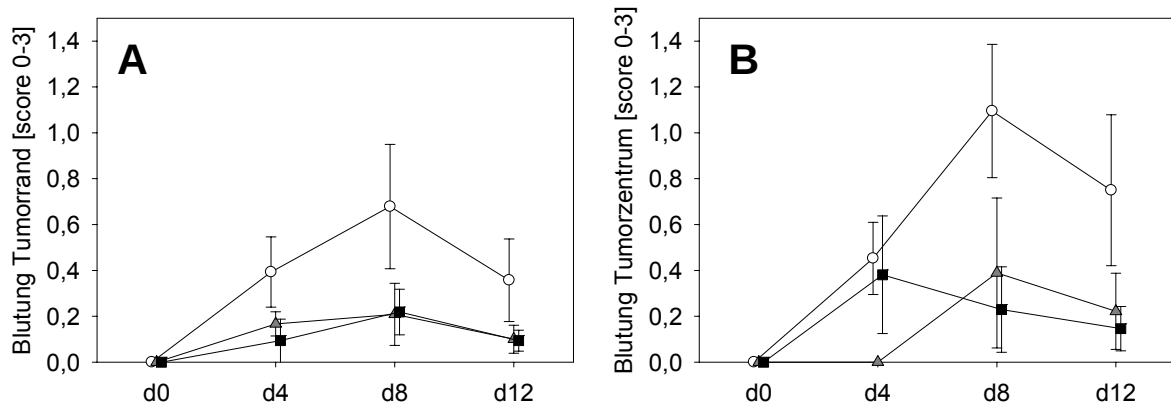


Abb. 19: Petechiale Einblutungen in den Tumoren als Mittelwert aller untersuchten Felder. Score der Blutung im Bereich des Tumorrandes (A) und im Tumorzentrum (B). Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke.

4.9 Leukozytenadhäsion nach Leberresektion

Nach Leberresektion fand sich eine wachsende Anzahl adhärenter Leukozyten in den kleinen Tumorgefäßen im Randbereich und Tumorzentrum der Kontrolltiere über den Beobachtungszeitraum (siehe Abb. 20). Es fanden sich am 12. Tag 14 ± 1 Leukozyten pro Feld im Tumorrand und 11 ± 1 pro Feld im Tumorzentrum. Die Behandlung mit Cyclosporin führte zu einer Verminderung der adhärenter Leukozyten auf 6 ± 2 im Tumorrand und 7 ± 2 im Tumorzentrum pro untersuchtem Feld. Die Gabe von Rapamycin bewirkte eine deutliche Reduzierung der adhärenter Leukozyten, so dass nur noch einzelne Leukozyten am 8. Tag und am 12. Tag (2 ± 1) dem Endothelium der Tumorgefäße anhafteten. Da auch hier die Kapillardichte in den Tumoren, der mit Rapamycin behandelten Tiere sehr gering war, wurde die Anzahl adhärenter Leukozyten pro mm Gefäßlänge erneut ausgewertet. Hier zeigte sich, daß die Zahl adhärenter Leukozyten im Tumorrand der Kontrolltiere gegenüber den mit Cyclosporin oder Rapamycin behandelten Tieren während des gesamten Beobachtungszeitraums, mit einem Maximum am 4. Tag nach Tumorzellimplantation

erhöht waren (siehe Abb. 20). Die Behandlung mit Cyclosporin reduzierte in geringem Ausmaße die Zahl adhärenter Leukozyten am 4. Tag gegenüber den Kontrollen. Demgegenüber verminderte Rapamycin die Zahl adhärenter Leukozyten am 8. Tag gegenüber den Kontrolltumoren, als auch gegenüber den mit Cyclosporin behandelten Tumoren. Dieser Effekt konnte auch noch am Ende des Beobachtungszeitraums gesehen werden.

Die Leukozytenadhärenz im Tumorzentrum war in der Tendenz vergleichbar mit derjenigen im Tumorrand (siehe Abb. 20).

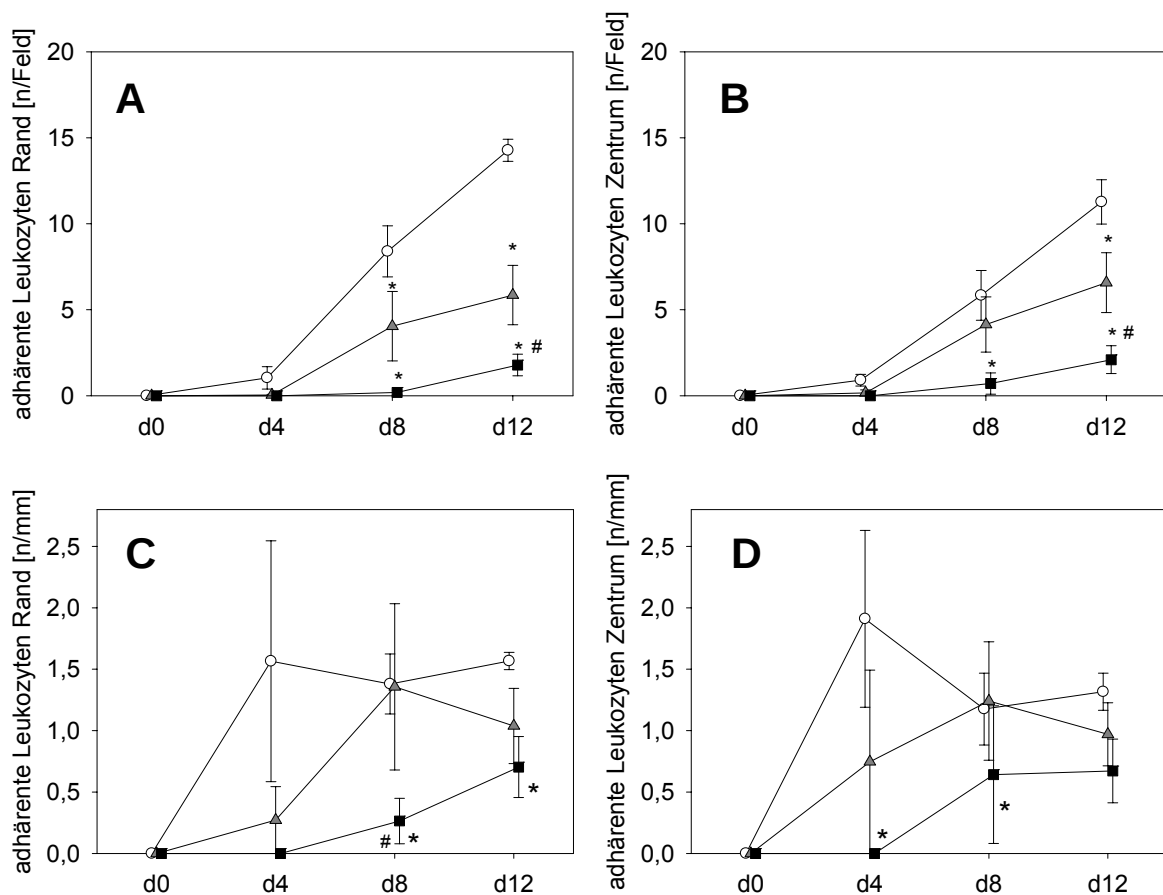


Abb. 20: Anzahl adhärenter Leukozyten pro Beobachtungsfeld im Tumorrand (A) und im Tumorzentrum (B) und Anzahl adhärenter Leukozyten pro mm Gefäßlänge im Tumorrand (C) und im Tumorzentrum (D), Kontrolle: weiße Kreise, Cyclosporin: graue Dreiecke, Rapamycin: schwarze Vierecke. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. Cyclosporin)

4.10 Tumorzellproliferation und Apoptose

Die immunhistochemische Färbung der Tumoren zeigte, daß in den Kontrollen $50,6 \pm 5,0\%$ der Tumorzellen PCNA positiv waren. Die Behandlung mit Cyclosporin verminderte den Anteil der PCNA-positiven Zellen auf $32,8 \pm 7,8\%$. Rapamycin hingegen bewirkte eine signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation auf $23,8 \pm 2,8\%$.

In allen Versuchsgruppen nach Leberresektion fanden sich nur vereinzelt Caspase-3 positive Tumorzellen ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

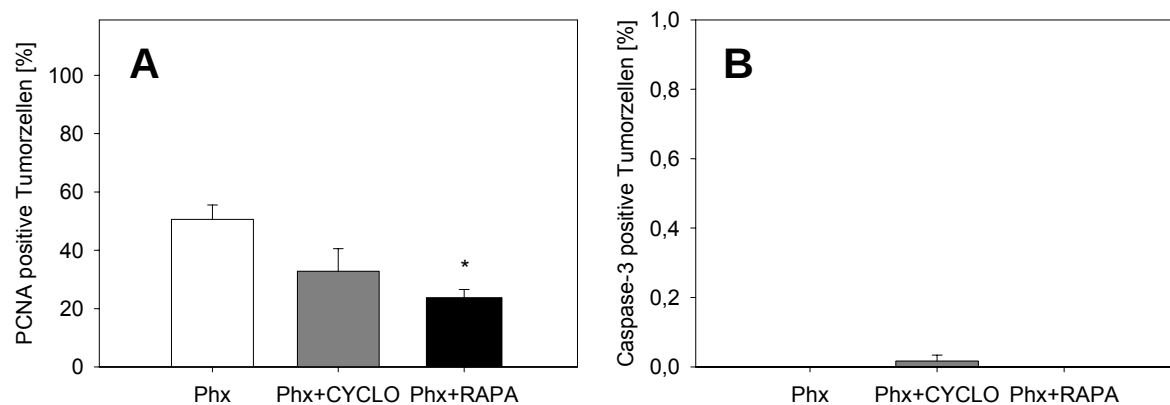


Abb. 21: Auswertung von Tumorzellproliferation (A; PCNA-Färbung) und –apoptose (B; Caspase-3-Färbung) 12 Tage nach Tumorzellimplantation und Leberresektion unter Rapamycin (Phx+RAPA) und Cyclosporin (Phx+CYCLO) Behandlung. PBS-behandelte Tiere nach Leberresektion (Phx) dienen der Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 Das Tierversuchsmodell

Das Modell der Rückenhautkammer ist bei Mäusen und auch Hamstern ein etabliertes Modell zur Beobachtung intravitaler Vorgänge durch mikroskopische Analysen. Insbesondere die Entwicklung der mikrovaskulären Versorgung von in die Rückenhautkammer transplantierten Geweben lässt sich in diesem Modell einfach und genau erfassen. (Menger MD 2002, Lehr HA 1993). In der vorliegenden Studie wurden syngene Kolonkarzinomzellen in die Rückenhautkammer von Balb/c-Mäusen implantiert. Unter Syngenität versteht man die genetische Gleichheit, in diesem Fall von Tumorzellen und Empfängertier, was Abstoßungsreaktionen verhindert. Auch das syngene Tumormodell ist etabliert und schon oft verwendet (Kollmar O 2007a, 2008, Rupertus K 2007).

Die Vorzüge des Tiermodells sind die Möglichkeit der repetitiven intravitalmikroskopischen Untersuchung und somit Erfassung der Entwicklung der intravitalen Vorgänge in einem Zeitraum von mehreren Tagen. Diese Möglichkeiten sind weder in Vitro noch intraoperativ beim Menschen in dieser Form zu bewerkstelligen. Außerdem ist das Modell immer wieder gut zu reproduzieren.

Nachteilig ist allerdings die möglicherweise fehlende direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen durch verschiedene Stoffwechsel- und Wachstumsmechanismen der Zellen. Desweiteren will man beim Menschen die Auswirkungen auf Metastasen der Leber als Hauptmetastasierungsort des Kolonkarzinoms untersuchen. Im Mausmodell werden die Adenokarzinom-Zellen in die Haut implantiert.

In der Arbeit wurde Rapamycin in einer Dosis von 1,5 mg/kg/Tag und Cyclosporin in einer Dosis von 10 mg/kg/Tag verwendet. Guba et al. konnten in ihren Studien feststellen, dass eine Dosis von 1,5 mg/kg/Tag Rapamycin bei einer Überlebensrate von 100% zu einer signifikanten Verminderung des Tumorwachstums führt (Guba M 2002). 10 mg/kg/Tag Cyclosporin ist bei Mäusen eine etablierte immunsuppressive Dosis mit einer geringen Nebenwirkungsrate (Guba M 2002, Babany G 1988).

5.2 Tumorwachstum unter Rapamycin und Cyclosporinbehandlung

Bei Behandlung mit Rapamycin in immunsuppressiven Dosen kommt es bei den Tieren mit intakter Leberstruktur zu einer signifikanten Hemmung des metastatischen Tumorwachstums. Somit besitzt Rapamycin therapeutischen Nutzen sowohl bei der Behandlung von Metastasen als auch bei der Verhinderung einer Tumorentstehung bei Patienten mit Immunsuppression nach Transplantation. Diese Eigenschaft von Rapamycin auf das metastatische Tumorwachstum wurde bereits in vorausgehenden Studien belegt (Guba M 2002).

Im Gegensatz zu Guba et al., die ein beschleunigtes Tumorwachstum nach Behandlung mit Cyclosporin sahen, konnte eine leichte, wenn auch nicht signifikante antitumorale Wirkung bei der Behandlung mit Cyclosporin gezeigt werden. Die Unterschiede lassen sich vielleicht durch die Abwesenheit eines größeren operativen Traumas in erst genannter Studie erklären.

Der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT/mTOR Signalweg spielt eine entscheidende Rolle im Tumorzellmetabolismus, auch von Karzinomen des Verdauungstraktes (Vivanco I 2002). PI3K wird durch die Bindung von

Wachstumsfaktoren an Rezeptortyrosinkinasen aktiviert und führt zu einer nachgeschalteten Aktivierung von AKT, was wiederum zu einer Aktivierung von mTOR führt (Faivre S 2006). Vermittelt durch nachgeschaltete Effektormoleküle, reguliert mTOR die Verbindung von Wachstumsstimuli zum Fortschreiten des Zellzyklus und ist an der Regulation von mRNA Transkription und Proteintranslation beteiligt (Schmelzle T 2000, Thomas G 1997). Onkogenaktivierung wie z.B. K-RAS Mutationen, die typisch für kolorektale Malignome sind, führen zu einer Aktivierung von PI3K und bewirken so eine Fehlregulierung des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs (Faivre S 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Signalwege mit mTOR Beteiligung in menschlichen Malignomen häufig hochreguliert sind (Schmelzle T 2000). Als Konsequenz blockieren mTOR Inhibitoren das Fortschreiten im Zell-Zyklus und vermitteln antiproliferative Effekte (Nourse J 1994).

Im Hinblick auf die Tumorzellproliferation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der PCNA-Färbung im Gruppenvergleich, bei einer leicht reduzierten Zahl positiver Zellen nach Cyclosporin Behandlung. In verschiedenen Studien konnte eine Hemmung der Tumorzellproliferation unter Rapamycin Therapie nur bei hohen Blutkonzentrationen (1µg/ml) und nicht im therapeutischen Bereich gefunden werden (Hansel DE 2010, Guba M 2002). In vivo Untersuchungen zeigten einen Arrest der Zellen in der G1 Phase (Boffa DJ 2004, Luan FL 2002). Für Cyclosporin gibt es Hinweise für eine Tumorprogression durch Zell-autonome Mechanismen (Hojo M 1999), gesichert ist bisher allerdings nur eine Hemmung der Tumorzellproliferation in menschlichen Gliomzellen (Zupanska A 2005). Letzteres könnte die in der vorliegenden Arbeit gefundene Hemmung des Tumorwachstums mitunter erklären.

5.3 Angiogenese unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung

Eine essentielle Voraussetzung zum längerfristigen Fortbestehen und Wachstum von Metastasen ist die Ausbildung eines versorgenden Gefäßsystems (Folkman J 2002). Ein Einsetzen von Angiogenese wird schon ab einer Tumorzellzahl von 100-300 Zellen gesehen (Li CY 2000). Nach Behandlung mit Rapamycin zeigte sich eine signifikant verminderte Kapillardichte am 8., sowie 12. Tag nach Tumorzellimplantation im Vergleich zur Behandlung mit Cyclosporin, bzw. im Vergleich zu den Kontrollen. Diese Eigenschaft von Rapamycin konnte in verschiedenen Studien sowohl für Endometrium als auch Tumorzellen belegt werden (Laschke MW 2006, Guba M 2002). Die Beobachtungen erklären auch das reduzierte Tumorwachstum nach Rapamycinbehandlung, da Voraussetzung für eine ausreichende Nährstoffversorgung des Tumors ein versorgendes Gefäßnetzwerk ist und eine direkte Hemmung der Tumorzellproliferation durch immunsuppressive Dosen von Rapamycin nicht gegeben ist (Hansel DE 2010, Guba M 2002). Guba et al. beobachteten in ihrer Studie eine verminderte VEGF Expression und ein vermindertes Ansprechen endothelialer Zellen auf die VEGF Stimulation als vermuteten vorherrschenden Angiogenese-hemmenden Mechanismus. Hypoxie aktiviert Hypoxia-Inducible Transcriptions Factor (HIF-1 α), welcher wiederum die Expression von VEGF, bFGF, PDGF und ANG-2 bewirkt (Humar R 2002). VEGF führt über weitere Signalkaskaden zur Proliferation von Endothelzellen. In diesen Kaskaden ist mTOR ein zwischengeschalteter Mediator, der durch Rapamycin gehemmt werden kann. Laschke et al. konnten diesen Sachverhalt am Endometrium bestätigen. Auch sie sahen eine verminderte VEGF Expression und vermindertes Auftreten von Endothelzellen im Aortenring Versuch (Laschke MW 2006). Desweiteren konnte für Rapamycin eine Unterbrechung neu geformter

Gefäßnetzwerke durch Thrombose in den kleinen Gefäßen, vermittelt durch eine erhöhte Tissue Factor Expression gezeigt werden, was eine weitere Ursache einer verminderten Nährstoffversorgung der mit Rapamycin behandelten Tumoren darstellt (Guba M 2005).

VEGF wurde auch als VPF (vascular permeability factor) bezeichnet, da eine Eigenschaft von VEGF die Erhöhung der Durchlässigkeit der Gefäßwand für Blutplasma, aber auch Leukozyten oder Erythrozyten im Rahmen der Ausbildung neuer Gefäße darstellt (Cao R 2004). In der vorliegenden Studie wurde aus diesem Grund auch die Durchlässigkeit der Gefäße durch Auswertung der petechialen Blutungen bestimmt. Hier zeigte sich eine leicht vermindertes Auftreten petechialer Blutungen in den mit Rapamycin behandelten Tumoren, allerdings ohne signifikante Gruppenunterschiede.

Am 8.Tag nach Tumorimplantation zeigte sich eine signifikante Hemmung der Blutflußgeschwindigkeit in den neuen Kapillaren sowohl unter Behandlung mit Rapamycin als auch unter Behandlung mit Cyclosporin. Guba et al. fanden Hinweise, dass Rapamycin eine selektive Thrombose von Tumorgefäßen aufgrund einer verstärkten, durch VEGF vermittelten, Freisetzung von Gewebsfaktoren und dadurch eine Thrombusbildung am Endothel fördert (Guba M 2005). Auch für Calcineurininhibitoren gibt es Hinweise auf prothrombotische Eigenschaften (Püschel A 2008), was auch nach Behandlung mit Cyclosporin die verminderte Blutflussgeschwindigkeit miterklären kann.

5.4 Tumorwachstum nach Leberresektion unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung

Palmes et al zeigten, dass Rapamycin signifikant die Genexpression wichtiger Cytokine und Wachstumsfaktoren, wie HGF, Plättchenfaktor (PDGF) oder Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF)-1, die nach Leberresektion freigesetzt werden, vermindert. Desweiteren verzögert Rapamycin die Zunahme von VEGF und VEGFR1 Expression in der Restleber in der frühen Phase der Leberregeneration (Palmes D 2008). Diese Effekte waren interessanterweise nur von kurzer Dauer, so dass die Leberregeneration bis zum 14 Tag komplett abgeschlossen war (Palmes D 2008). Zu diesen Resultaten passen auch die Ergebnisse dieser Studie, bei der sich kein Einfluss der Behandlung mit Rapamycin oder Cyclosporin auf die Leberregeneration bis zum 12. Tag nach Resektion zeigte. Es waren keine signifikanten Unterschiede im Feuchtgewicht der Leber am 12. Tag nach Leberresektion zwischen den Tieren nach Rapamycingabe, verglichen mit denen nach Placebo Gabe, und dem Lebergewicht der Laparotomietiere festzustellen. Das deutet darauf hin, dass trotz der Möglichkeit der verzögerten Regeneration des Leberparenchyms, Rapamycin die Leberregeneration nicht unterdrückt. Frühere experimentelle Studien, die von einer Unterdrückung der Leberregeneration durch Behandlung mit Rapamycin berichteten, waren auf die frühe postoperative Phase beschränkt und widersprechen daher den Ergebnissen dieser Arbeit nicht (Kirimlioglu H 2006, Nelsen CJ 2003, Dahmen U 2002, Jiang YP 2001, Chávez R 1999, Francavilla A 1992). Obwohl gezeigt wurde, dass Cyclosporin in experimentellen Modellen hepatotrophe Effekte besitzt, wurden auch in diesen Studien die Effekte einer Behandlung mit Cyclosporin auf die Leberregeneration nur in der frühen postoperativen Phase untersucht (Kirimlioglu H 2006, Francavilla A 1991). In dieser Hinsicht geben sie uns keine Auskunft darüber,

ob der hepatotrophe Effekt von Cyclosporin in der späten Phase der Leberregeneration weiterhin messbar oder aber nicht mehr nachweisbar ist.

Interessanterweise konnte eine signifikante postoperative Mortalität nur nach Leberresektion und Cyclosporin Behandlung beobachtet werden, wohingegen keines der mit Rapamycin behandelten Tiere starb. Einer der Hauptunterschiede, die gegensätzlichen Effekte von Cyclosporin und Rapamycin betreffend, ist die Nephrotoxizität, welche sich häufig während der Therapie mit Cyclosporin entwickelt, aber nicht nach Behandlung mit Rapamycin beobachtet werden kann (Furukawa H 2004). Mit Cyclosporin behandelte Tiere, die unter einer postoperativen renalen Dysfunktion leiden, sterben möglicherweise deshalb in der postoperativen Phase, wohingegen mit Rapamycin behandelte Mäuse, überleben. Die Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von Palmes und Mitarbeitern, die ebenfalls keine Zunahme der postoperativen Mortalität bei Behandlung mit Rapamycin nach Leberresektion feststellten (Palmes D 2008). Allerdings zeigte sich nach Laparotomie und Behandlung mit Cyclosporin auch keine erhöhte Mortalität, so dass auch die Leberresektion vermutlich eine Rolle spielt. Eine Erklärung wäre eine erhöhte Blutkonzentration von Cyclosporin durch eine verminderte Cyclosporin Clearance der Restleber. Shinohara et al. konnten eine signifikante Zunahme der Blutkonzentration an Cyclosporin nur nach einer 90%igen Leberresektion nachweisen, wobei sie nur die frühe Phase bis 72 Stunden nach Leberresektion untersuchten (Shinohara H 2007). Takaya et al. hingegen konnten eine Zunahme der Cyclosporin Blutkonzentration schon bei einer 70 prozentigen Leberresektion im Rahmen einer längeren Beobachtungszeitraums beobachteten (Takaya S 1989).

Eine ausgedehnte Leberresektion ist vergesellschaftet mit einer Stimulation des extrahepatischen Tumorwachstums durch eine verstärkte Tumorneovaskularisation und Tumorzellproliferation (Garcia-Alonso I 2008, Rupertus K 2007, Harun N 2007). Im Rahmen der Regeneration nach Leberresektion, konnte eine vermehrte Ausschüttung verschiedener potenter Wachstumsfaktoren, wie z.B. Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und Gefäßendothelwachstumsfaktor (VEGF) und Chemoaminen wie Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2) und Interleukin-8 (IL-8) nachgewiesen werden, die ins Bild eines verstärkten metastatischen Tumorwachstums passen würden (Yoon SS 2006, Oe H 2005, Drixler TA 2000).

Rupertus et al. konnte nachweisen, dass nur eine ausgedehnte Leberresektion von 70% zu einer signifikanten Verstärkung von Neovaskularisation, Migration und Anwachsen extrahepatisch implantierter Tumorzellen führt, wobei eine Leberresektion von 30% keine signifikanten Unterschiede zeigte (Rupertus K 2007). Desweiteren konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Leberresektion und Engraftment (Anwachsen) von extrahepatischen Metastasen gezeigt werden, welcher durch MIP-2 vermittelt wird. Neben Hemmung der Angiogenese und des Wachstums intrahepatischer Metastasen führte die Inhibition von MIP-2 bei extrahepatischen Metastasen zu einem verzögerten Engraftment nach Leberresektion und zu einer verminderten Expression des MIP-2 Rezeptor CXCR-2 (Kollmar O 2006, 2007a). Auch Stromal Cell-Derived Factor (SDF) 1 mit seinem Rezeptor CXCR-4 fördert Tumorzellmigration und Wachstum extrahepatischer Metastasen abhängig von der Angiogenese durch Tumorzellproliferation und Inhibition von Apoptose, wobei es nach Leberresektion auch nach Blockung von SDF-1 zu Angiogenese und Tumorwachstum durch einen alternativen VEGF-

abhängigen Weg zur Aktivierung der SDF-1 Rezeptoren CXCR-4 und -7 kommt (Kollmar O 2007b, 2010).

Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) wurde erstmals bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses gefunden (Tan EM 1982). Desweiteren wurde die Beziehung zu Zellproliferation und die Lokalisation in Nucleoli in der G1-S Phase nachgewiesen (Takasaki Y 1981, Myiachi K 1978). Chan et al. konnten PCNA in der Folge auch in Tumorzellen nachweisen (Chan PK 1983). In der vorliegenden Studie zeigte sich nach Leberresektion in den Kontrollen eine deutliche Zunahme PCNA positiver Zellen im Tumor, was im Einklang mit den Voruntersuchungen steht (Rupertus K 2007). Nach Behandlung mit Cyclosporin zeigte sich ein deutlicher, wenn auch nicht signifikanter Rückgang PCNA positiver Zellen, nach Rapamycin eine signifikante Reduktion PCNA positiver Zellen. Für Cyclosporin lässt sich dieser Sachverhalt mitunter dadurch erklären, dass auch für Cyclosporin antiproliferative Effekte beschrieben wurden (Zupanska A 2005, Twentyman PR 1988). Insgesamt kam es allerdings sowohl bei Cyclosporin, als auch in stärkerem Maße bei Rapamycin zu einer verstärkten Proliferationshemmung nach Leberresektion. Eine Ursache hierfür könnte der nach Leberresektion verminderte P450 Stoffwechsel sein, von dem sowohl Rapamycin, als auch Cyclosporin abhängig sind, wodurch es zu erhöhten Serumkonzentrationen der Medikamente kommen kann (Lodewijk L 2009, Nagayoshi S 2008).

Caspase-3 ist eine Cysteinprotease, die eine wichtige Rolle während der Apoptose spielt, wo sie in erhöhten Mengen vorkommt, Aktin und Laminin spaltet und Nukleasen zur Auflösung der DNA aktiviert (Darmon AJ 1995). Es zeigten sich sowohl in den Kontrollen als auch in den mit Cyclosporin oder Rapamycin behandelten Tumoren bei der immunhistochemischen Färbung nur vereinzelt

apoptotische Zellen ohne signifikante Gruppenunterschiede, was für eine gute Tumurvitalität spricht.

5.5 Angiogenese nach Leberresektion unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung

Im Hinblick auf die Angiogenese zeigten sich auch nach Leberresektion keine gruppenspezifischen Unterschiede. Bis zum 12. Tag nach Tumorimplantation fand sich sowohl bei den Kontrolltumoren, als auch nach Behandlung mit Cyclosporin und Rapamycin in allen beobachteten Feldern neu gebildete Gefäße. Somit scheint Rapamycin die Gefäßneubildung nicht komplett zu unterdrücken, sondern nur zu hemmen.

Auch nach Leberresektion zeigte sich die Kapillardichte unter Rapamycin Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen und der Cyclosporin Behandlung signifikant vermindert. Somit bleibt die Angiogenese-hemmende Wirkung auch nach Leberresektion bestehen. Interessanterweise zeigte sich nach Leberresektion auch eine signifikante Hemmung der Angiogenese nach Cyclosporin Behandlung am 12. Tag. Shah et al. sahen in ihren Untersuchungen eine Reduktion der Angiogenese unter höheren Dosen von Cyclosporin (Shah G 2008). Nach Leberresektion kommt es zu einer Hemmung des P450 vermittelten Abbaus der Immunsuppressiva Cyclosporin und Rapamycin (Lodewijk L 2009, Nagayoshi S 2008). Steigt hierdurch die Serumkonzentration von Cyclosporin kann es folglich zu einer Dosis-abhängigen Hemmung der Angiogenese auch durch Cyclosporin kommen.

Nach Leberresektion kommt es zu einer signifikanten Hemmung der Blutflußgeschwindigkeit durch Rapamycin im Vergleich zur Behandlung mit

Cyclosporin und im Vergleich zu den Kontrolltumoren, sowohl am 8., als auch am 12. Tag. Die Verminderung der Blutflußgeschwindigkeit ist für Rapamycin nach Leberresektion noch deutlicher, auch hier spielt möglicherweise ein durch die Leberresektion erhöhte Serumkonzentration von Rapamycin eine Rolle.

Die petechialen Blutungen als Hinweis auf noch unreife, oder sich neu bildende Gefäße (Cao R 2004) zeigten ein Maximum am 8. Tag, aber keine signifikanten Gruppenunterschiede. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass sich bis zum 8. Tag sowohl bei den Kontrollen, als auch unter Therapie mit Cyclosporin und Rapamycin noch eine größere Zahl neuer Gefäße entsteht. Am 12. Tag zeigt sich eine Abnahme der petechialen Blutungen. Bis zu diesem Zeitpunkt hat sich entsprechend schon ein „reifes“ Gefäßnetzwerk etabliert.

5.6 Inflammatorische Antwort unter Rapamycin und Cyclosporin Behandlung

Nur unter Behandlung mit Rapamycin zeigte sich sowohl nach Sham Operation als auch nach Leberresektion eine signifikante Hemmung der Leukozyteninfiltration im Tumorgebiet im Vergleich zu den Kontrollen. Diese Eigenschaft fand sich verstärkt nach Leberresektion im Hinblick auf adhärente Leukozyten pro Millimeter Gefäßlänge am 4. Und 8. und 12. Tag nach Tumorimplantation. Unter Therapie mit Cyclosporin zeigte sich auch nach Leberresektion keine signifikante Minderung der adhärenen Leukozyten pro Millimeter Gefäßlänge. Für Rapamycin konnte eine effektive Unterdrückung von inflammatorischen Zytokinen gezeigt werden (Ma KL 2007). Desweiteren vermindert Rapamycin die Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel und reduziert damit die Adhäsion von Monozyten an der Extrazellulärmatrix (Gouëffic Y 2007, Wood SC 2006). Im Gegensatz zu Cyclosporin,

welches auch die Leukozytenadhäsion reduziert, wurden für Rapamycin auch eine Inhibition der Extravasation von Leukozyten bei chronischer Colitis gezeigt (Farkas S 2006). Yi et al. haben nachgewiesen, dass Rapamycin die Interferon γ Expression nach Transplantation effektiver unterdrückt als Cyclosporin (Yi T 2006). Die Zusammenschau dieser Ergebnisse könnte somit eine Erklärung für die signifikante Minderung der Leukozytenadhäsion unter Rapamycinbehandlung auch nach Leberresektion geben.

5.7 Schlussfolgerung

Rapamycin vermindert das Wachstum extrahepatischer Metastasen nach Leberresektion im Vergleich zu Cyclosporin signifikant. Diese Eigenschaft beruht auf einer verminderten Ausbildung neuer, den Tumor versorgender Gefäße, als auch auf direkten antiproliferativen Effekten. Die Leberregeneration wird durch immunsuppressive Dosen von Rapamycin innerhalb eines 12 tägigen Beobachtungszeitraums nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz zur Behandlung mit Cyclosporin nach Leberresektion zeigt sich nach Behandlung mit Rapamycin keine erhöhte Mortalität der Versuchstiere. Rapamycin bewirkt auch nach Stimulation des Tumorwachstums durch eine ausgedehnte Leberresektion eine effektive Suppression des Tumorwachstums. Desweiteren vermindert Rapamycin noch ausgeprägter als Cyclosporin die inflammatorische Antwort auf den Tumor nach Leberresektion.

Daher bietet die Behandlung mit Rapamycin bei Patienten, die sich einer Leberresektion aufgrund kolorektaler Metastasen unterziehen, in der postoperativen Phase eine interessante neue Strategie einem frühen Tumorrezidiv vorzubeugen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA (2004). Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 239:818-825.
2. Andromanakos N, Filippou D, Papadopoulos V, Kouraklis G, Christianakis E, Kostakis A (2007). New concepts in the therapeutic options of liver metastases from colorectal cancer. *J BUON* 12:445-452
3. Arichi N, Kishikawa H, Nishimura K, Mitsui Y, Namba Y, Tokugawa S, Ichikawa Y (2008). Malignancy following kidney transplantation. *Transplant Proc* 40:2400-2402.
4. Arsham AM, Plas DR, Thompson CB, Simon MC (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription. *J Biol Chem* 277:15162–15170
5. Atkins D, Ferrone S, Schmahl GE, Störkel S, Seliger B (2004). Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* 171:885-889.
6. Babany G, Morris RE, Babany I, Kates RE (1988). Evaluation of the in vivo dose-response relationship of immunosuppressive drugs using a mouse heart transplant model: application to cyclosporine. *J Pharmacol Exp Ther* 244:259-262
7. Basu A, Contreras AG, Datta D, Flynn E, Zeng L, Cohen HT, Briscoe DM, Pal S (2008). Overexpression of vascular endothelial growth factor and the development of post-transplantation cancer. *Cancer Res* 68:5689-5698
8. Bennett JJ, Schmidt CR, Klimstra DS, Grobmyer SR, Ishill NM, D'Angelica M, DeMatteo RP, Fong Y, Blumgart LH, Jarnagin WR (2008). Perihepatic lymph node micrometastases impact outcome after partial hepatectomy for colorectal metastases. *Ann Surg Oncol* 15:1130-1136.

9. Bianco R, Garofalo S, Rosa R, Damiano V, Gelardi T, Daniele G, Marciano R, Ciardiello F, Tortora G (2008). Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs. *Br J Cancer* 98:923-930.
10. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P (1987). Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328:614-616.
11. Boffa DJ, Luan F, Thomas D, Yang H, Sharma VK, Lagman M, Suthanthiran M (2004). Rapamycin Inhibits the Growth and Metastatic Progression of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 10:293–300.
12. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6:468-475.
13. Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J (2004). Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res* 94:664-670.
14. Chan PK, Frakes R, Tan EM, Brattain MG, Smetana K, Busch H (1983). Indirect immunofluorescence studies of proliferating cell nuclear antigen in nucleoli of human tumor and normal tissues. *Cancer Res* 43:3770-3777.
15. Chávez R, Jamieson N, Takamori S, Nivatvongs S, Pino G, Metcalfe A, Watson C, Romero D, Metcalfe S (1999). Hepatotrophic effect of cyclosporine and FK 506 is not mimicked by rapamycin. *Transplant Proc* 31:2429.
16. Dahmen U, Gu Y, Shen K, Dirsch O, Li J, Fan L, Broelsch C (2002). Onset of liver regeneration after subtotal resection is inhibited by the use of new immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* 34:2312-2313.
17. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377:446-448.

18. De Jong KP, Lont HE, Bijma AM, Brouwers MA, de Vries EG, van Veen ML, Marquet RL, Slooff MJ, Terpstra OT (1995). The effect of partial hepatectomy on tumor growth in rats: in vivo and in vitro studies. *Hepatology* 22:1263-1272.
19. De Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP (1998). Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol* 184:53.
20. De Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP (2001). Expression of growth factors, growth factor receptors and apoptosis related proteins in invasive breast cancer: Relation to apoptotic rate. *Breast Cancer Res Treat* 66:201.
21. Delgado M, Fernández R, Paradela M, De La Torre M, González D, García JA, Borro JM (2008). Development of Neoplasms During Lung Transplantation Follow-up. *Transplant Proc* 40:3094-3096.
22. Drixler TA, Borel Rinkes IH, Ritchie ED, van Vroonhoven TJ, Gebbink MF, Voest EE (2000). Continuous administration of angiostatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastases after partial hepatectomy. *Cancer Res* 60:1761-1765
23. Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Melino MR, Sigal NH (1990). Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J Immunol* 144: 251-258
24. Ellis LM (2003). A targeted approach for antiangiogenic therapy of metastatic human colon cancer. *Am Surg* 69:3-10.
25. Faivre S, Kroemer G, Raymond E (2006). Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5:671-688.
26. Farkas S, Hornung M, Sattler C, Guba M, Steinbauer M, Anthuber M, Herfarth H, Schlitt HJ, Geissler EK (2006). Rapamycin decreases leukocyte migration in vivo and effectively reduces experimentally induced chronic colitis. *Int J Colorectal Dis* 21:747-753.

27. Flechner SM, Kobashigawa J, Klintmalm G (2008). Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: focus on improving renal function and nephrotoxicity. *Clin Transplant* 22:1-15.
28. Folkman J (1971). Tumour angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182–1186.
29. Folkman J (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29:15-18.
30. Francavilla A, Starzl TE, Barone M, Zeng QH, Porter KA, Zeevi A, Markus PM, van den Brink MR, Todo S (1991). Studies on mechanisms of augmentation of liver regeneration by cyclosporine and FK 506. *Hepatology* 14:140-143.
31. Francavilla A, Starzl TE, Scotti C, Carrieri G, Azzarone A, Zeng QH, Porter KA, Schreiber SL (1992). Inhibition of liver, kidney, and intestine regeneration by rapamycin. *Transplantation*. 53:496-498.
32. Fung JJ, Jain A, Kwak EJ, Kusne S, Dvorchik I, Eghtesad B (2001). De novo malignancies after liver transplantation: a major cause of late death. *Liver Transpl* 7:109-118.
33. Furukawa H, Todo S (2004). Evolution of immunosuppression in liver transplantation: contribution of cyclosporine. *Transplant Proc* 36:274-284.
34. García-Alonso I, Palomares T, Alonso A, Echenique-Elizondo M, Caramés J, Castro B, Méndez J (2008). Effect of liver resection on the progression and growth of rhabdomyosarcoma metastases in a rat model. *J Surg Res* 148:185-190.
35. Gohji K, Nomi M, Hara I, Arakawa S, Kamidono S (1998). Influence of cytokines and growth factors on matrix metalloproteinase-2 production and invasion of human renal cancer. *Urol Res* 26:33-37.
36. Gouëffic Y, Potter-Perigo S, Chan CK, Johnson PY, Braun K, Evanko SP, Wight TN (2007). Sirolimus blocks the accumulation of hyaluronan (HA) by arterial smooth muscle cells and reduces monocyte adhesion to the ECM. *Atherosclerosis* 195:23-30.

37. Gridelli C, Maione P, Rossi A (2008). The potential role of mTOR inhibitors in non-small cell lung cancer. *Oncologist* 13:139-147.
38. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK (2002). Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 8:128-135.
39. Guba M, Yezhelyev M, Eichhorn ME, Schmid G, Ischenko I, Papyan A, Graeb C, Seeliger H, Geissler EK, Jauch KW, Bruns CJ (2005). Rapamycin induces tumor-specific thrombosis via tissue factor in the presence of VEGF. *Blood* 105:4463-4469.
40. Hansel DE, Platt E, Orloff M, Harwalker J, Sethu S, Hicks JL, De Marzo A, Steinle RE, Hsi ED, Theodorescu D, Ching CB, Eng C (2010). Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Regulates Cellular Proliferation and Tumor Growth in Urothelial Carcinoma. *Am J Pathol* 2010 Apr 15.
41. Harun N, Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C (2007). Liver regeneration stimulates tumor metastases. *J Surg Res* 138:284-290.
42. Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B (2007). *Duale Reihe – Chirurgie*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, S. 1346-1349.
43. Higgins GM, Anderson RM (1931). Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12:186-202
44. Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR (1996). The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 80:40-45.
45. Hölzel D, Eckel R, Engel J (2008). Metastasierung beim kolorektalen Karzinom. *Der Chirurg* 2008, S. 1-3.
46. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M (1999). Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 397:530-534.

47. Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Battegay EJ (2002). Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *FASEB J* 16:771–780
48. Husman G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. Robert Koch Institut Berlin S. 36.
49. Jiang YP, Ballou LM, Lin RZ (2001). Rapamycin-insensitive regulation of 4e-BP1 in regenerating rat liver. *J Biol Chem* 276:10943-10951.
50. Kahan BD (2000). Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapamune US Study Group. *Lancet* 356:194-202.
51. Kirimlioglu H, Kirimlioglu V, Yilmaz S, Coban S, Turkmen E, Ara C (2006). Liver pathology and cell proliferation after calcineurin inhibitors and antiproliferative drugs following partial hepatectomy in rats. *Transplant Proc* 38:622-626.
52. Klaus GG, Hawrylowicz CM (1984). Activation and proliferation signals in mouse B cells. II. Evidence for activation (G0 to G1) signals differing in sensitivity to cyclosporine. *Eur J Immunol* 14:250-254.
53. Koehl GE, Andrassy J, Guba M, Richter S, Kroemer A, Scherer MN, Steinbauer M, Graeb C, Schlitt HJ, Jauch KW, Geissler EK (2004). Rapamycin protects Allografts from Rejection while simultaneously attacking Tumors in immunosuppressed Mice. *Transplantation* 77:1319–1326.
54. Kollmar O, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK (2006a). Macrophage inflammatory protein-2 promotes angiogenesis, cell migration, and tumor growth in hepatic metastasis. *Ann Surg Oncol* 13:263-75.
55. Kollmar O, Menger MD, Schilling MK (2006b). Macrophage inflammatory protein-2 contributes to liver resection-induced acceleration of hepatic metastatic tumor growth. *World J Gastroenterol* 14;12:858-867.

56. Kollmar O, Junker B, Rupertus K, Menger MD, Schilling MK (2007a). Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis. *Eur J Surg Oncol* 33:803-811.
57. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Junker B, Tilton B, Schilling MK, Menger MD (2007b). Stromal cell-derived factor-1 promotes cell migration and tumor growth of colorectal metastasis. *Neoplasia* 9:862-870.
58. Kollmar O, Junker B, Rupertus K, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK (2008). Liver resection-associated macrophage inflammatory protein-2 stimulates engraftment but not growth of colorectal metastasis at extrahepatic sites. *J Surg Res* 145:295-302.
59. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Nickels RM, Haberl GC, Tilton B, Menger MD, Schilling MK (2010). CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *Int J Cancer* 126:1302-1315.
60. Konstantinopoulos PA, VANDOROS GP, Karamouzis MV, Gkermepesi M, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG (2007). EGF-R is expressed and AP-1 and NF-kappaB are activated in stromal myofibroblasts surrounding colon adenocarcinomas paralleling expression of COX-2 and VEGF. *Cell Oncol* 29:477-482.
61. Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B, Menger MD (2006). Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol* 149:137-44.
62. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K (1993). Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143:1055-1062.
63. Lennard-Jones JE, Morson BC, Ritchie JK, Shove DC, Williams CB (1977). Cancer in colitis: assessment of the individual risk by clinical and histological criteria. *Gastroenterology* 73:1280-1289.
64. LeRoith D, Baserga R, Helman L, Roberts CT Jr. (1995). Insulin-like growth factors and cancer. *Ann Intern Med* 122:54.

65. Li CY, Shan S, Huang Q, Braun RD, Lanzen J, Hu K, Lin P, Dewhirst MW (2000). Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst* 19;92:143-147
66. Lodewijk L, Mall A, Spearman CW, Kahn D (2009). Effect of liver regeneration on the pharmacokinetics of immunosuppressive drugs. *Transplant Proc* 41:379-381.
67. Lu CY, Sicher SC, Vazquez MA (1993). Prevention and treatment of renal allograft rejection: new therapeutic approaches and new insights into established therapies. *J Am Soc Nephrol* 4:1239-1256.
68. Luan FL, Hojo M, Maluccio M, Yamaji K, Suthanthiran M (2002). Rapamycin blocks tumor progression: unlinking immunosuppression from antitumor efficacy. *Transplantation* 73:1565-1572.
69. Luan FL, Ding R, Sharma VK, Chon WJ, Lagman M, Suthanthiran M (2003). Rapamycin is an effective inhibitor of human renal cancer metastasis. *Kidney Int* 63:917-926.
70. Lukomska B, Dluzniewska J, Polanski J, Zajac L (2004). Expression of growth factors in colorectal carcinoma liver metastatic patients after partial hepatectomy: Implications for a functional role in cell proliferation during liver regeneration. *Comp Hepatol* 3:52.
71. Lutz J, Heemann U (2003). Tumours after kidney transplantation. *Curr Opin Urol* 13:105-109.
72. Lynch HT, Kimberling W, Albano WA, Lynch JF, Biscione K, Schuelke GS, Sandberg AA, Lipkin M, Deschner EE, Mikol YB (1985). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). I. Clinical description of resource. *Cancer* 56:934-938.
73. Ma KL, Ruan XZ, Powis SH, Moorhead JF, Varghese Z (2007). Anti-atherosclerotic effects of sirolimus on human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:2721-2728.
74. Matsumoto K, Nakamura T (1991). Hepatocyte growth factor: Molecular structure and implications for a central role in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 6:509.

75. Menger MD, Laschke MW, Vollmar B (2002). Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34:83-91.
76. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM (1978). Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121:2228-2234.
77. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.
78. Muratore A, Ribero D, Zimmitti G, Mellano A, Langella S, Capussotti L (2010). Resection Margin and Recurrence-Free Survival after Liver Resection of Colorectal Metastases. *Ann Surg Oncol* 17:1324-1329.
79. Nagayoshi S, Kawashita Y, Eguchi S, Kamohara Y, Takatsuki M, Miyamoto S, Mochizuki S, Soyama A, Tokai H, Hidaka M, Tajima Y, Kanematsu T (2008). Metabolism for cyclosporin A during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *World J Gastroenterol* 14:6355-6359.
80. Nagy P, Teramoto T, Factor VM, Sanchez A, Schnur J, Paku S, Thorgeirsson SS (2001). Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat. *Hepatology* 33:339-345.
81. Nelsen CJ, Rickheim DG, Tucker MM, Hansen LK, Albrecht JH (2003). Evidence that cyclin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes. *J Biol Chem* 278:3656-3663.
82. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M, Jaeck D, Mirza D, Parks RW, Collette L, Praet M, Bethe U, Van Cutsem E, Scheithauer W, Gruenberger T (2008). Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet* 371:1007-1016.

83. Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM (1994). Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372:570-573.
84. Oe H, Kaido T, Mori A, Onodera H, Imamura M (2005). Hepatocyte growth factor as well as vascular endothelial growth factor gene induction effectively promotes liver regeneration after hepatectomy in Solt-Farber rats. *Hepatogastroenterology* 52:1393-1397.
85. Palmes D, Zibert A, Budny T, Bahde R, Minin E, Kebschull L, Hölzen J, Schmidt H, Spiegel HU (2008). Impact of rapamycin on liver regeneration. *Virchows Arch* 452:545-557.
86. Panis Y, Ribeiro J, Chrétien Y, Nordlinger B. (1992). Dormant liver metastases: an experimental study. *Br J Surg.* 79:221-223.
87. Papadimitriou JM, Van Duijn P, Brederoo P, Streefkerk JG (1976). A new method for the cytochemical demonstration of peroxidase for light, fluorescence and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 24:82-90.
88. Pawlik TM, Schulick RD, Choti MA (2008). Expanding criteria for resectability of colorectal liver metastases. *Oncologist* 13:51-64.
89. Picardo A, Karpoff HM, Ng B, Lee J, Brennan MF, Fong Y (1998). Partial hepatectomy accelerates local tumor growth: potential roles of local cytokine activation. *Surgery* 124:57-64.
90. Piontek M, Porschen R (1994). Growth inhibition of human gastrointestinal cancer cells by cyclosporin A. *J Cancer Res Clin Oncol* 120:695-699.
91. Püschel A, Lindenblatt N, Katzfuß J, Vollmar B, Klar E (2008). Calcineurin inhibitors accelerate microvascular thrombus formation in vivo. *Chirurgisches Forum* 37:193-194.
92. Redaelli CA, Semela D, Carrick FE, Ledermann M, Candinas D, Sauter B, Dufour JF (2004). Effect of vascular endothelial growth factor on functional recovery after hepatectomy in lean and obese mice. *J Hepatol* 40:305-312.

93. Rubie C, Kollmar O, Frick VO, Wagner M, Brittner B, Gräber S, Schilling MK (2008). Differential CXCR3 receptor expression in colorectal carcinomas. *Scand J Immunol* 68:635-44.
94. Rupertus K, Kollmar O, Scheuer C, Junker B, Menger MD, Schilling MK (2007). Major but not minor hepatectomy accelerates engraftment of extrahepatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 24:39-48.
95. Saloman DS, Bianco C, Ebert AD, Khan NI, De Santis M, Normanno N, Wechselberger C, Seno M, Williams K, Sanicola M, Foley S, Gullick WJ, Persico G (2000). The EGF-CFC family: Novel epidermal growth factor-related proteins in development and cancer. *Endocr Relat Cancer* 7:199.
96. Saydjari R, Townsend CM Jr, Barranco SC, James E, Thompson JC (1986). Effects of cyclosporin A and alpha-difluoromethylornithine on the growth of hamster pancreatic cancer in vitro. *J Natl Cancer Inst* 77:1087-92.
97. Saydjari R, Townsend CM Jr, Barranco SC, Thompson JC (1987). Effects of cyclosporine and alpha-difluoromethylornithine on the growth of mouse colon cancer in vitro. *Life Sci* 40:359-366.
98. Schmelzle T, Hall MN (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103:253-262.
99. Sehgal SN (1998). Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 31:335-340.
100. Shah G, Middleton FA, Gentile KL, Tripathi S, Bruch D, Maier KG, Kittur DS (2008). Cyclosporine inhibition of angiogenesis involves the transcription factor HESR1. *J Surg Res* 149:171-176.
101. Shinohara H, Shimada M, Ogasawara T, Morine Y, Ikemoto T, Imura S, Fujii M (2007). Pharmacokinetics of cyclosporine A after massive hepatectomy: a hint for small-for-size graft in living donor liver transplantation. *Dig Dis Sci* 52:2490-2496.

102. Sierra JR, Corso S, Caione L, Cepero V, Conrotto P, Cignetti A, Piacibello W, Kumanogoh A, Kikutani H, Comoglio PM, Tamagnone L, Giordano S (2008). Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *J Exp Med* 205:1673-1685.
103. Singh P, Dai B, Yallampalli U, Lu X, Schroy PC (1996). Proliferation and differentiation of a human colon cancer cell line (CaCo2) is associated with significant changes in the expression and secretion of insulin-like growth factor (IGF) IGF-II and IGF binding protein-4: Role of IGF-II. *Endocrinology* 137:1764.
104. Slooter GD, Marquet RL, Jeekel J, Ijzermans JN (1995). Tumour growth stimulation after partial hepatectomy can be reduced by treatment with tumour necrosis factor alpha. *Br J Surg* 82:129-132.
105. Souza-Offtermatt G, Staubach K-H, Sterk P, Udolph A (2004). *Intensivkurs Chirurgie*, 1. Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München.
106. Taieb J, Artru P, Paye F, Louvet C, Perez N, Andre T, Gayet B, Hebbar M, Goebel FM, Tournigand C, Parc R, de Gramont A (2005). Intensive Systemic Chemotherapy Combined With Surgery for Metastatic Colorectal Cancer: Results of a Phase II Study. *J Clin Oncol* 23:502-509.
107. Takasaki Y, Deng JS, Tan EM (1981). A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med* 154:1899-1909.
108. Takaya S, Iwatsuki S, Noguchi T, Koie H, Zaghloul I, Venkataramanan R, Starzl TE (1989). The influence of liver dysfunction on cyclosporine pharmacokinetics--a comparison between 70 per cent hepatectomy and complete bile duct ligation in dogs. *Jpn J Surg* 19:49-56.
109. Tan EM (1982). Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33:167-240.
110. Thomas G, Hall MN (1997). TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 9:782-787.

111. Thorball N (1981). FITC-dextran tracers in microcirculatory and permeability studies using combined fluorescence stereo microscopy, fluorescence light microscopy and electron microscopy. *Histochemistry* 71:209-233
112. Tolnay E, Kuhnen C, Wiethage T, König JE, Voss B, Müller KM (1998). Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor c-Met are overexpressed and associated with an increased microvessel density in malignant pleural mesothelioma. *J Cancer Res Clin Oncol* 124:291.
113. Tucci MG, Lucarini G, Brancorsini D, Zizzi A, Pagnaloni A, Giacchetti A, Ricotti G, Biagini G (2007). Involvement of E-cadherin, beta-catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 157:1212-1216.
114. Twentyman PR (1988). A possible role for cyclosporins in cancer chemotherapy. *Anticancer Res* 8:985-993.
115. Van de Vrie W, Marquet RL, Eggermont AM (1997). Cyclosporin A enhances locoregional metastasis of the CC531 rat colon tumour. *J Cancer Res Clin Oncol* 123:21-24.
116. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot* 28:721–726.
117. Vivanco I, Sawyers CL (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501.
118. Wei AC, Greig PD, Grant D, Taylor B, Langer B, Gallinger S (2006). Survival after hepatic resection for colorectal metastases: a 10-year experience. *Ann Surg Oncol* 13:668-76.
119. Wiederrecht GJ, Sabers CJ, Brunn GJ, Martin MM, Dumont FJ, Abraham RT (1995). Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase Progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res* 1: 53-71 .

120. Wood SC, Bushar G, Tesfamariam B (2006). Inhibition of mammalian target of rapamycin modulates expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Toxicol Lett* 165:242-249.
121. Yi T, Cuchara L, Wang Y, Koh KP, Ranjbaran H, Tellides G, Pober JS, Lorber MI (2006). Human allograft arterial injury is ameliorated by sirolimus and cyclosporine and correlates with suppression of interferon-gamma. *Transplantation* 81:559-566.
122. Yoon SS, Tanabe KK (1999). Surgical treatment and other regional treatments for colorectal cancer liver metastases. *Oncologist* 4:197-208.
123. Yoon SS, Kim SH, Gonen M, Heffernan NM, Detwiler KY, Jarnagin WR, D'Angelica M, Blumgart LH, Tanabe KK, Dematteo RP (2006). Profile of plasma angiogenic factors before and after hepatectomy for colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg Oncol* 13:353-362.
124. Zupanska A, Dziembowska M, Ellert-Miklaszewska A, Gaweda-Walerych K, Kaminska B (2005). Cyclosporine a induces growth arrest or programmed cell death of human glioma cells. *Neurochem Int* 47:430-41.

Publikationen

Rupertus K, Dahlem C, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O (2009). Rapamycin inhibits hepatectomy-induced stimulation of metastatic tumor growth by reduction of angiogenesis, microvascular blood perfusion, and tumor cell proliferation. Ann Surg Oncol 16:2629-37.

Vortrag

Rapamycin hemmt das Wachstum kolorektaler Metastasen nach Leberresektion durch Inhibition der Angiogenese und Tumorzellproliferation

C. Dahlem, K. Rupertus, M. K. Schilling, M. D. Menger, O. Kollmar

Chirurgisches Forum 2009, Kongresszentrum München

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Schilling und Herrn Prof. Dr. Menger danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Otto Kollmar und Dr. Kathrin Rupertus für die hervorragende fachliche Betreuung der Arbeit, die Anleitung zum selbstständigen experimentellen Arbeiten, die konstruktive Kritik bei Durchsicht des Manuskripts, sowie die Unterstützung bei den Vortragsvorbereitungen.

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

Bei Dr. Claudia Scheuer bedanke ich mich für die Anlage der Zellkulturen.

Danke an Gudrun Haberl für die Unterstützung bei zeitlichen Engpässen.

Ein großes Dankeschön auch an alle Mitarbeiter des Institutes für experimentelle Chirurgie der Universitätskliniken in Homburg für die unübertroffene Kollegialität, danke für die offenen Ohren, die Unterstützung und die Feiern, die das Arbeiten angenehmer gestalteten.

Lebenslauf

Name: Dahlem Christian

Geboren am: 12. Oktober 1981

In: Heidelberg

Wohnhaft: 66740 Saarlouis, Saarlouiser Straße 71

Religion: katholisch

Familienstand: ledig

Grundschule Siersburg: 1988 bis 1992

Gymnasium Dillingen: 1992 bis 2001

Zivildienst: 2001 bis 2002 DRK-Rettungswache Saarlouis, Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium der Medizin: Oktober 2002 bis November 2008 an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Berufl. Werdegang: seit Januar 2009 Arzt in Weiterbildung zum Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie, St. Elisabeth-Klinik Saarlouis, Saarlouis