

Aus dem
Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
Universitätsklinikum des Saarlandes
Homburg/Saar
Direktor: Professor Dr. med. Michael Menger
Betreuung: Professor Dr. med. Otto Kollmar

**EINFLUSS VON DARBEPOETIN- α
AUF EXTRAHEPATISCHE METASTASEN
DES KOLOREKTALEN KARZINOMS
NACH LEBERRESEKTION
IM MAUSMODELL**

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016

vorgelegt von Sebastian Senger
geboren am 20.01.1984 in Lichtenfels

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
1.1 Einfluss von Darbepoetin- α auf extrahepatische Metastasen des kolorektalen Karzinoms nach Leberresektion im Mausmodell	1
2 Summary	3
2.1 Effect of DPO on extrahepatic metastases of colorectal cancer after liver resection in the mouse	3
3 Einleitung	5
3.1 Geschichtlicher Überblick der Entdeckung Erythropoetins	5
3.2 Physiologische Eigenschaften von EPO	6
3.3 Der EPO-Rezeptor	7
3.4 EPO-Einsatz in der Onkologie	8
3.5 Das kolorektale Karzinom	9
3.6 Metastasierung von Tumorzellen	9
3.7 Leberresektion	10
3.8 Leberregeneration unter DPO	11
3.9 Einfluss der Leberregeneration auf Tumorzellen	12
4 Ziel der Arbeit	14
5 Material und Methoden	15
5.1 Zellbiologische Methoden	15
5.1.1 Tumorzell-Linie	15
5.1.2 GFP-Transfektion der CT26.WT-Zellen	15
5.1.3 Kultivierung der Tumorzellen	16
5.1.4 Bestimmung der Zellzahl	16
5.2 Tierexperimentelles Modell	17
5.2.1 Versuchstiere und Haltung	17
5.2.2 Rückenhautkammer-Modell	17
5.2.3 Leberresektion	20
5.2.4 Implantation der Tumorzellen	21
5.2.5 Behandlung mit DPO	22
5.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	23
5.3.1 Mikroskopietechnik	23
5.3.2 Mikroskopieprotokoll	23

5.3.3	Computerassistierte Auswertung der Intravitalmikroskopie	24
5.4	Probenentnahme und Konservierung	26
5.5	Histologie und Immunhistochemie	26
5.6	Tierexperimentelles Protokoll	28
5.6.1	Versuchsgruppen und zeitlicher Ablauf	28
5.6.2	Versuchsabschnitt Ia	29
5.6.3	Versuchsabschnitt Ib	29
5.6.4	Versuchsabschnitt IIa	29
5.6.5	Versuchsabschnitt IIb	30
5.7	Statistik	30
6	Ergebnisse	31
6.1	Wirkung von DPO auf das Anwachsen extrahepatisch implantierter CT26.WT-Zellen.....	31
6.1.1	Tumorwachstum	31
6.1.2	Angiogenese.....	32
6.1.3	Migration	33
6.1.4	Infiltration	34
6.1.5	Proliferation.....	34
6.1.6	Apoptose.....	35
6.1.7	Lebergewicht und Blutanalysen	35
6.1.8	Tabellarische Zusammenfassung Abschnitt Ia	35
6.2	Wirkung von DPO auf das Anwachsen extrahepatisch implantierter CT26.WT-Zellen nach 70%iger Leberresektion.....	36
6.2.1	Tumorwachstum	36
6.2.2	Angiogenese.....	37
6.2.3	Migration	38
6.2.4	Infiltration	39
6.2.5	Proliferation.....	39
6.2.6	Apoptose.....	40
6.2.7	Lebergewicht und Blutanalysen	40
6.2.8	Tabellarische Zusammenfassung des Abschnittes Ib.....	40
6.3	Wirkung von DPO auf etablierte extrahepatische CT26.WT-Tumormetastasen.....	41
6.3.1	Tumorwachstum	41
6.3.2	Angiogenese.....	41
6.3.3	Migration	42
6.3.4	Infiltration	42
6.3.5	Proliferation.....	42

6.3.6	Apoptose.....	43
6.3.7	Lebergewicht und Blutanalysen.....	43
6.3.8	Tabellarische Zusammenfassung des Abschnittes IIa.....	43
6.4	Wirkung von DPO auf etablierte extrahepatische CT26.WT-Tumormetastasen nach 70%iger Leberresektion.....	44
6.4.1	Tumorstadiums	44
6.4.2	Angiogenese.....	44
6.4.3	Migration.....	45
6.4.4	Infiltration	45
6.4.5	Proliferation.....	45
6.4.6	Apoptose.....	46
6.4.7	Lebergewicht und Blutanalysen.....	46
6.4.8	Tabellarische Zusammenfassung des Abschnittes IIb.....	47
7	Diskussion.....	48
7.1	Tumormodell kolorektaler Metastasen in der Rückenhautkammer.....	48
7.2	Wirkung von DPO auf das Anwachsen extrahepatischer Metastasen.....	48
7.3	Wirkung von DPO auf etablierte extrahepatische Metastasen	53
7.4	Systemische Wirkung von DPO.....	54
7.5	Zusammenfassung und klinischer Ausblick.....	55
8	Literaturverzeichnis.....	57
9	Publikationen	70
9.1	Publikationen.....	70
9.2	Publizierte Abstracts.....	70
10	Danksagung	72

1 Zusammenfassung

1.1 Einfluss von Darbepoetin- α auf extrahepatische Metastasen des kolorektalen Karzinoms nach Leberresektion im Mausmodell

Die erfolgreiche Behandlung des kolorektalen Karzinoms wird häufig durch eine nicht mehr kontrollierbare Metastasenausbreitung limitiert. Daher ist es von großem klinischem Interesse, die Metastasierung zu begrenzen und das Überleben der Patienten zu verbessern. Bei der Behandlung von Lebermetastasen ist die Leberresektion (Phx) die Therapie der Wahl. Erythropoetin (EPO) und sein Analogon Darbepoetin- α (DPO) können die Leberregeneration und Leberfunktion nach einer ausgedehnten Leberresektion verbessern. Allerdings steigern sie das durch eine Leberresektion induzierte Anwachsen von Tumorzellen in der verbliebenen Leber. Inwieweit EPO und seine Analoga das Wachstum von extrahepatischen Metastasen des kolorektalen Karzinoms beeinflussen, ist nicht bekannt. Daher war Ziel dieser Arbeit, die Auswirkung einer perioperativen Behandlung mit DPO nach ausgedehnter Leberresektion auf das Anwachsen von extrahepatischen Metastasen und auf das Wachstum von bereits etablierten extrahepatischen Metastasen zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden im syngenem Mausmodell CT26.WT-GFP Tumorzellen in eine Rückenhautkammer implantiert. Im ersten Teil der Arbeit wurde den Tieren der Behandlungsgruppe 10 μ g DPO pro Kilogramm Körpergewicht am Tag der Tumorimplantation verabreicht. Zusätzlich wurden Tiere nach 70%iger Phx mit DPO behandelt. Im zweiten Teil der Arbeit wurden extrahepatische Metastasen untersucht. Diesen Tieren wurde DPO erst am fünften Tag nach Zellimplantation verabreicht. Weiteren Tieren erhielten eine Leberresektion und DPO-Gabe nach fünf Tagen. Tumorwachstum, Gefäßneubildung, Tumorzellmigration sowie die Apoptose- und Proliferationsrate in den Tumoren wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie, sowie histologischer und immun-histochemischer Präparate untersucht.

Nach DPO-Gabe wurden ein beschleunigtes Anwachsen der Tumorzellen und eine leicht erhöhte Angiogenese festgestellt. Migration, Infiltration und Proliferation der Tumorzellen wurden nicht beeinflusst. In leberresezierten Tieren war nach DPO-Gabe das Tumorwachstum moderat und die Gefäßneubildung signifikant gesteigert. Migration,

Infiltration, Apoptose waren ebenso wie die Proliferation unbeeinflusst.

In etablierten Metastasen wurde kein Effekt auf das Tumorwachstum, die Angiogenese und die Infiltration durch DPO beobachtet. Es konnte jedoch eine gesteigerte Proliferation der Tumorzellen festgestellt werden. Nach Leberresektion und DPO-Gabe war die Proliferation signifikant gesteigert.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse am ehesten auf eine beschleunigende Wirkung von DPO auf die Etablierung extrahepatischer kolorektaler Metastasen durch gesteigerte Proliferation und Gefäßneubildung schließen. Da sich diese Effekte jedoch deutlich abgeschwächer als bei intrahepatischen Metastasen darstellten, muss bei der systemischen Applikation von DPO ein dosisabhängiger Effekt vermutet werden. Schlussfolgernd sollte daher beim Nachweis extrahepatischer Metastasen keine EPO Therapie zur Unterstützung der Leberregeneration erfolgen, da dies gegebenenfalls das Wachstum der extrahepatischen Metastasen begünstigt.

2 Summary

2.1 Effect of DPO on extrahepatic metastases of colorectal cancer after liver resection in the mouse

The outcome of patients suffering from colorectal cancer strongly depends on the uncontrollable outgrowth of metastases. The treatment of choice of liver metastases is still the surgical resection. Erythropoietin and its analogue darbepoetin- α (DPO) have been shown to improve liver regeneration and function after hepatectomy (Phx). Previous experimental studies have demonstrated that DPO significantly enhances Phx-induced engraftment of colorectal liver metastases by increasing neovascularization and tumor cell proliferation. There is no information, however, whether EPO or DPO also stimulates the engraftment and growth of extrahepatic metastases. Therefore, the present study analyzed the effects of DPO on the engraftment of extrahepatic colorectal tumor cells after major hepatectomy. Furthermore potential effects of DPO and Phx on established extrahepatic metastases were investigated.

For this purpose CT26.WT-GFP colorectal cancer cells were implanted into dorsal skinfold chambers of syngeneic BALB/c mice. In the first part of the study, animals received a single systemic dose of DPO (10 μ g/kg body weight) at the day of tumor cell implantation. PBS-treated animals served as controls. To study whether the effect of DPO is influenced by Phx, additional animals with and without DPO treatment underwent 70% Phx at day 0. In the second part of the study, animals received DPO treatment at day 5 after tumor cell implantation and/or underwent 70% hepatectomy to analyze the effect of DPO on established metastases. Tumor vascularization and growth as well as tumor cell migration, proliferation and apoptosis were studied repetitively over 14 days using intravital fluorescence microscopy, histology and immunohistochemistry.

In non-hepatectomized animals DPO significantly accelerated extrahepatic tumor cell engraftment and slightly enhanced tumor neovascularization. In hepatectomized animals DPO slightly enhanced extrahepatic tumor cell engraftment and significantly accelerated tumor neovascularization. Of interest, DPO did not affect tumor cell migration and infiltration. In established metastases DPO did not significantly affect tumor growth, tumor cell migration, infiltration and apoptosis. This was not dependent on Phx. Only tumor cell proliferation was significantly increased during DPO therapy after Phx.

In conclusion, the present study indicates that DPO accelerates extrahepatic engraftment of colorectal cancer cells, most probably by stimulating proliferation and the process of neovascularization during the early stage of tumorigenesis. These promoting effects were less pronounced when compared to the effect on intrahepatic tumour cells. Nonetheless treatment with EPO after Phx to support liver regeneration is not recommended in case of extrahepatic metastases, due to possible stimulation of metastatic growth.

3 Einleitung

3.1 Geschichtlicher Überblick der Entdeckung Erythropoetins

Seit jeher faszinierte Blut die Menschheit. Seine vitale Bedeutung für den Menschen spiegelt sich in allen Kulturen seit der Frühzeit wieder. Sowohl die Viersäftelehre Galens als auch die Lehre des Aderlasses zeigen, wie sehr man Blut einen bedeutenden Platz in der Heilung von Krankheiten einräumte. Mitte des 19. Jahrhunderts erkannten französische Ärzte einen indirekten Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Sauerstoffpartialdruck und des Hämatokrits bei der Blutanalyse von Probanden, welche sich zuvor in alpinen Höhenlagen aufgehalten hatten (Bert et Jourdanet, 1873 zitiert nach Ribatti, 2008). Erstmals postulierten Carnot und Deflandre 1906 die Regulation der Erythropoese durch einen hormonellen Faktor, welchen sie Hemopoietin nannten (Carnot et Deflandre, 1906 zitiert nach Ribatti, 2008). Sie versetzten Kaninchen durch einen Blutungsstimulus in eine anämische Kreislaufsituation. Nach Serum-Transfusionen dieser Tiere wurde in Empfängertieren ein Anstieg der Retikulozyten beobachtet. Weitere tierexperimentelle Studien beschrieben ebenfalls einen Faktor im Plasma hypoxischer oder anämischer Spender, der in Empfängertieren die Erythropoese steigerte (Sander, 1932; Hjorte, 1936 zitiert nach Ribatti, 2008). Bonsdorff und Jalavisto verwendeten 1948 hierfür erstmals den Begriff „Erythropoetin“ (EPO), um dessen Wirkung auf die Erythrozytenproduktion zu beschreiben (Bonsdorff et Jalavisto, 1948 zitiert nach Ribatti, 2008). Als primäres Syntheseorgan von EPO wurde die Niere identifiziert (Kuratowska et al., 1961 zitiert nach Ribatti, 2008). Des Weiteren zeigte sich eine extrarenale EPO-Produktion in geringeren Umfang unter anderem in Leber und Knochenmarkszellen (Koury et al., 1991). Aufgrund der geringen Plasmakonzentration an zirkulierendem EPO benötigten Goldwasser und Kung über 2000 Liter Urin anämischer Patienten, um wenige Milligramm des Hormons zu isolieren (Goldwasser et Kung, 1968). Basierend auf diesen Daten war nun eine Identifizierung und Klonierung des humanen EPO-Gens in *Escherichia coli* möglich (Lin et al., 1985; Lee-Huang, 1984). Ein Jahr danach beschrieb Winearls die erste erfolgreiche Anämie-Therapie bei chronischen Nierenerkrankungen durch den Einsatz von rekombinant hergestelltem humanem EPO (rhuEPO) (Winearls et al., 1986). Zur Gruppe der Erythropoese stimulierenden Medikamente (erythropoiesis-stimulating agents, ESAs) zählt man neben rhuEPO weitere gentechnisch veränderte EPO-Derivate, wie etwa Darbepoetin- α (DPO) der Firma Amgen, dessen

Serumhalbwertszeit durch Modifizierung der endständigen Sialinsäurereste um den Faktor 3 gesteigert wurde (Amgen, 2011). In den folgenden Jahren wurden die molekularen Signalwege des Hormons erschlossen.

3.2 Physiologische Eigenschaften von EPO

EPO ist ein 30,4kDa schweres Glykoprotein. Die genetische Information ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert und codiert ein PräPro-EPO-Protein mit 193 Aminosäurenresten. Dieses erfährt eine posttranslationale Modifizierung mittels Abspaltung eines Signalpeptides von 27 Aminosäureresten am N-terminalen Ende und Abspaltung eines Argininrestes C-terminal (Sasaki et al., 2000). Zwei Disulfid-Brückenbindungen stabilisieren die Molekularstruktur und sind für die Bioaktivität des Proteins essentiell (Lappin, 2003). Die peritubulären Nierenendothelzellen sind im adulten Säugetier der Hauptsyntheseort. Im fetalen Organismus wird EPO vorrangig durch das Lebergewebe gebildet (Maxwell et al., 1997). Eine zelluläre EPO-Speicherung findet nicht statt. Erst bei Hypoxie der Zelle erfolgt eine vermehrte Transkription des EPO-Gens. Eine hypoxische Stoffwechsellage aktiviert den Transkriptionsfaktor hypoxia-induced-factor 1 (HIF-1) (Semenza, 2004). Dieser besteht aus zwei Untereinheiten, HIF-1 α und HIF-1 β . Während HIF-1 β in stabiler Form vorliegt, wird HIF-1 α bei physiologischem Sauerstoffgehalt kontinuierlich synthetisiert, nach Markierung durch die HIF-Prolyl-Hydroxylase aber auch kontinuierlich abgebaut. Da dieses Enzym Sauerstoff als Coenzym benötigt, wird es bei hypoxischen Stoffwechselbedingungen inhibiert und HIF-1 α kann akkumulieren. Die beiden Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β können den HIF-1 Komplex ausbilden, und aktivieren daraufhin im Zellkern die Transkription des EPO-Gens. Neben EPO verstärkt HIF-1 unter anderem auch die Synthese von vascular-endothelial-growth-factor (VEGF), Hämoxygenase und Transferrin (Fandrey et al., 2004).

Die Hauptfunktion des Hormons liegt in der Steigerung der Erythropoese. Es bindet im Knochenmark vor allem an den reiferen Vorläuferzellen der Proerythroblasten und der Erythroid Colony Forming Unit (CFU-E). EPO verhindert die Apoptose dieser Zelllinie und führt in Synergismus mit anderen Wachstumsfaktoren zur Ausdifferenzierung in Normoblasten, Retikulozyten und letztendlich zur Erythrozytenreifung (Jelkmann, 2004). Die Dichte des Erythropoetin-Rezeptors (EPO-R) ist bei den Vorstufen der Erythropoese auf den CFU-E am höchsten. Die EPO-R-Konzentration nimmt dann mit steigendem Differenzierungsgrad der Zellen erneut ab (Broudy et al., 1991). Die Expression von EPO

und EPO-R wurde auch in nicht-hämatopoetischen Zellen, unter anderem Neuronen, Astrozyten, Endothelzellen und den Reproduktionsorganen nachgewiesen (Masuda et al., 1993; Marti et al., 1996; Anagnostou et al., 1994; Asano et al., 2015). Die Analyse etablierter Tumorzelllinien zeigte ebenfalls eine Expression der Rezeptoren in gängigen in vitro Modellen (Acs et al., 2001; Farrell et al., 2004). Eine EPO-R-Expression wurde auch in soliden Tumoren, wie dem Nierenzellkarzinom (Westernfelder et al., 2000), Melanom (Selzer et al., 2000) und kolorektalem Karzinom (Chabowska et al., 2008; Baltaziak et al., 2013), nachgewiesen.

3.3 Der EPO-Rezeptor

EPO-R, auch bekannt als p66, wird zur Gruppe der Chemokin-Rezeptoren gezählt. Er ist in eine extrazelluläre, transmembranöse und intrazelluläre Domäne untergliedert. Ein EPO-Molekül bindet an zwei benachbarte EPO-R der Zelloberfläche, woraus eine Dimerisierung der beiden Rezeptoren resultiert. Ein einzelner EPO-R besitzt keine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität. Die Dimerisierung der Rezeptoren hat allerdings die Aktivierung von vier Signalkaskaden durch Phosphorylierungs-Prozesse zur Folge. Diese sind der MAP-Kinase/ERK Signalweg (MAPK/ERK), der Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT Signalweg (PI3K/Akt), der Protein Kinase C Signalweg (PKC) und der JAK/STAT5 Signalweg.

Die Dimerisierung des EPO-R führt zur Aktivierung einer Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase (JAK2) durch Transphosphorylierung. JAK2 wiederum phosphoryliert Tyrosinreste der intrazellulären Domäne des EPO-R, welche nun als Bindungsstellen für intrazelluläre Proteine mit SH2-Domänen fungieren (Komatsu et al., 1992). STAT5 als Mitglied der STAT-Proteine (signal transducer and activator of transcription) bildet durch die Aktivierung von JAK2 ein Homodimer, welches in den Zellkern übertritt. Die Bindung an spezifische STAT-Domänen der DNS resultiert in der Steigerung der Proliferation und Inhibierung der Apoptose (Lin et al., 2000). Durch Phosphorylierung der Proteine SOS und GBR2 erfolgt die Aktivierung des RAS-Moleküls. Dieses wiederum aktiviert unter GDP-Abspaltung sowohl den PI3K Signalweg als auch die MAPK/ERK Signalkaskade (Chen et Sytkowski, 2001). EPO-R phosphoryliert ebenfalls Phospholipase C. Dies führt zur Hydrolyse membrangebundener GPI-Proteine und zur Aktivierung der PKC-Signalkaskade (Boudot et al., 1999). Diese Signalkaskaden resultieren in einer Translokation regulatorischer Faktoren in den Zellkern. Sowohl in gesunden als auch in

entarteten Zellen vermitteln sie eine gesteigerte Zellproliferation, eine Zelldifferenzierung, eine Invasionstendenz und eine Inhibierung der Apoptose (Lacombe et al., 1999; Silva, 2004; Dasari et al., 2010; Alvarez et al., 2010; Richmond et al., 2005; Baltaziak et al., 2013; Park et al., 2014; Yang et al., 2015).

3.4 EPO-Einsatz in der Onkologie

Während der Therapie einer malignen Tumorerkrankung ist häufig eine begleitende Anämie zu beobachten. Dies ist entweder auf den myelosuppressiven Effekt der Chemotherapie oder die onkologische Erkrankung selbst zurückzuführen (Groopman et Itri, 1999). Es zeigte sich, dass die Behandlung einer tumorassoziierten Anämie und der damit erzielten Vermeidung von Müdigkeit und Schwäche, die Lebensqualität der Patienten verbessert (Cella et al., 2004). Um die Anzahl von Bluttransfusionen zu reduzieren, wurden die Möglichkeiten einer medikamentösen Therapie der tumorassoziierten Anämie in klinischen Placebo-kontrollierten Studien evaluiert (Klein et al., 2007). Ziel war es, die transfusionsassoziierten Risiken, wie etwa Infektionsgefahr oder akutes Lungenversagen, zu reduzieren. Durch die Behandlung mit ESAs konnte so die Anzahl der Bluttransfusionen reduziert und die Lebensqualität verbessert werden (Littlewood et al., 2001; Vansteenkiste et al., 2002; Hedenus et al., 2003, Galli et al., 2015). Es erfolgte daher die Zulassung der ESAs wie DPO durch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung tumorassoziierten Anämie (Amgen, 2011) nach entsprechenden Leitlinien der amerikanischen Gesellschaft für klinische Onkologie und der amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie (Rizzo et al., 2002). Experimentelle Versuche zeigten eine verbesserte Radiosensitivität der Tumore unter EPO-Behandlung, am ehesten aufgrund einer erhöhten Oxygenierung des Tumorgewebes (Thews et al., 1998; Silver et al., 1999). Erste negative Auswirkungen einer ESAs-Therapie beschrieben Henke und Kollegen in der ENHANCE (Erythropoietin in Head and Neck Cancer)-Studie. Patienten mit Radiotherapie eines nasopharyngealen Tumors zeigten unter zusätzlicher Behandlung mit Epoetin β einen gesteigerten lokalen Tumorprogress und eine kürzere Überlebenszeit im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Henke et al., 2003). Des Weiteren wurde bei einer Placebo-kontrollierten Studie zur Behandlung metastasierender Mammakarzinome mit first-line Chemotherapie unter zusätzlicher Epoetin α Therapie eine erhöhte Mortalität in der Behandlungsgruppe festgestellt. Dies führte zum frühzeitigen Abbruch der Studie (Leyland-Jones et al., 2005). In Zusammenschau der klinischen Daten

mehrerer Studiengruppen, welche Krebspatienten mit ESAs behandelten, zeigte sich eine erhöhte Mortalität und Verschlechterung des Gesamtüberlebens (Bohlius et al., 2009; Tonelli et al., 2009). In Folge dessen warnte die amerikanische Zulassungsstelle vor den möglichen negativen Effekten der ESAs. Die amerikanische Gesellschaft für klinische Onkologie und die amerikanische Gesellschaft für Hämatologie empfahlen eine sorgfältige Risiko-Nutzen-Abwägung in der Behandlung von onkologischen Patienten mit ESAs und forderten zusätzliche Studien (Rizzo et al., 2010, Galli et al., 2015).

3.5 Das kolorektale Karzinom

In den USA stellt das kolorektale Karzinom die dritthäufigste maligne Tumorerkrankung beider Geschlechtern dar (Jemal et al., 2010). Des Weiteren ist es die dritthäufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen und Männern. In Deutschland ist Darmkrebs die dritthäufigste Krebsneuerkrankung bei Männern und zweithäufigste bei Frauen. Das kolorektale Karzinom ist die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern und dritthäufigste bei Frauen. Die altersstandardisierten Sterberaten sind bei beiden Geschlechtern in den letzten 10 Jahren um 20% zurückgegangen (Krebsregister in Deutschland e.V., 2013). Nicht zuletzt aufgrund der fortschrittlichen onkologischen und chirurgischen Therapieoptionen führen die Primärtumore nur noch selten zum Tode des Patienten (Fong et al., 1999; Chambers et al., 2002; Abdalla et al., 2004; Kopetz et al., 2009). Jedoch begrenzt die Metastasierung der Tumore in weitere Organe die Überlebenszeit der Patienten erheblich. Die Leber ist, unter anderem aufgrund des portalvenösen Zuflusses aus dem Darm, das am häufigsten betroffene Organ. Sekundäre Zielorgane der Tumorabsiedlungen sind Lunge, Knochen und Gehirn (Weiss et al., 1986). Intrahepatische Metastasen finden sich in über 50% der Krankheitsfälle. Über die Hälfte der Patienten zeigen extrahepatische Metastasen in fortgeschrittenen Stadien der Tumorerkrankung (Fong 1999; Abdalla et al., 2004). Die Entwicklung neuer adjuvanter Therapieansätze bei der Behandlung intrahepatischer Metastasen zur Reduktion der Rezidivrate ist daher von großem klinischen Interesse (Drixler et al., 2000; Chua et al., 2010; Chu et al., 2012; Liu et al., 2015).

3.6 Metastasierung von Tumorzellen

Die Metastasierung eines Tumors stellt für die behandelnden Ärzte eine Eskalation der

Krankheit dar. Die lokale Therapie des Primärtumors durch Bestrahlung oder Resektion muss um eine multimodale Therapie zur Behandlung der Metastasen ergänzt werden. Zu Beginn des Metastasierungsprozesses kommt es zum Durchbrechen der Basalmembran und Invasion in benachbarte Gewebekompartimente. Dies gelingt unter anderem durch Expression von Matrix-Metalloproteinasen, welche die extrazelluläre Matrix auflösen (McDonnel et al., 1999). Durch Reduktion von Cadherinen können sich die Tumorzellen aus dem Zellverband lösen und so in die Blutstrombahn gelangen (Conacci-Sorrell et al., 2002). Nach dem Übertreten in die Blutbahn kommt es in Abhängigkeit der anatomischen, hämodynamischen und physikalischen Eigenschaften zur Verbreitung der Tumorzellen in das Kapillarbett anderer Organe. Da die Metastasierung nicht rein zufällig ist, beschrieb Paget bereits 1889 erstmals die „Seed and Soil“ Theorie (Paget, 1989). Laut dieser Annahme metastasieren entsprechende primäre Tumorzellen (seeds) in Abhängigkeit der Eigenschaften entsprechender Zielorgane (soils). Dort wird das Anwachsen durch gewebespezifische Faktoren moduliert (Orimo et al., 2005; Mueller et Fusenig, 2004; Kollmar et al., 2006; Kollmar et al., 2010).

Das Anwachsen (in der englischen Literatur: „engraftment“) von Tumorzellen in anderen Organen allein bedingt jedoch keine Eskalation der Erkrankung. Die sogenannten in situ-Karzinome können aufgrund der limitierten Diffusionskapazität des Gewebes für Sauerstoff und Nährstoffe nur auf wenige Millimeter begrenzt heranwachsen (Gimbrone et al., 1972; Carmeliet et Jain, 2000; Kerbel et al., 2000; Vajkoczy et al., 2002). Erst durch die Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes erreichen genügend Nährstoffe und Sauerstoff die Mikrometastasen und begünstigen das Wachstum. Dieser Prozess wird in der Literatur auch als „angiogenic switch“ bezeichnet (Bergers et Benjamin, 2003). Durch Gewebshypoxie und/oder Onkogene überwiegen im Mikromilieu des Tumorzellverbandes angiogene Faktoren. Es kommt daraufhin zum Einwandern endothelialer Vorläuferzellen sowie zur Aussprossung neuer Gefäßäste aus bereits bestehenden Kapillaren und postkapillären Venolen des Zielorganes (Carmeliet et Jain, 2000; Okamoto et al., 2005). Die Tumorangiogenese stellt also einen entscheidenden Schritt in der Etablierung von soliden Metastasen dar.

3.7 Leberresektion

In der Behandlung sekundärer Lebertumore, wie etwa Metastasen des kolorektalen Karzinoms, ist die Leberresektion (eng. partial hepatectomy, Phx) unter aktuellem

Erkenntnisstand die Therapie der Wahl (Garcea et Maddern, 2009). Als mittlerweile etabliertes Therapieverfahren kann hiermit die Prognose der Patienten bei vergleichsweise geringem perioperativen Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko erheblich verbessert werden (Jarnagin et al., 2002; Choti et al., 2002; Imamura et al., 2003; Chang, 2004; von Heesen et al., 2012; Abdalla et al., 2013). Die Einstufung der Metastasen des Kolonkarzinoms als resezierbar oder primär nicht resezierbar richtet sich nach dem geplanten verbleibenden Lebergewebe. Bei gesunden Patienten sollten >20%, bei Patienten mit Leberschäden, etwa durch Chemotherapie, >30% und bei Patienten mit Leberzirrhose > 40% des Ausgangsvolumen erhalten bleiben (Abdalla, 2011). Es besteht daher bei einer ausgedehnten Leberresektion das Risiko eines postoperativen Leberversagens (Farges et al., 1999; Stewart et al., 2004). Eine Verbesserung der Überlebenszeit bei primär als nicht resezierbar eingestuftes Lebermetastasen wurde durch die konstante Weiterentwicklung der Operationstechniken und Therapieansätze, etwa durch Pfordaderastligatur oder portalvenöse Embolisation, erzielt (Abdalla, 2011; Schnitzbauer et al, 2012; Abdalla et al., 2013; Schadde et al, 2014). Es wurden jedoch auch bei einer Vielzahl der Krankheitsfälle sowohl intra- als auch extrahepatische Tumorrezidive beobachtet (Fong et al., 1999; Yamamoto et al., 1999; Abdalla et al., 2004).

3.8 Leberregeneration unter DPO

In der Biologie definiert man Regeneration als die Wiederherstellung einer zuvor abgetrennten Struktur ad integrum. So zum Beispiel das Nachwachsen einer abgetrennten Extremität aus undifferenzierten Zellen aus dem Stumpf (Fausto et al., 2006). Die Leberregeneration ist jedoch vielmehr auf ein kompensatorisches Wachstum der verbliebenen Hepatozyten als auf das Nachwachsen der resezierten Segmente aus undifferenzierten Zellen zurückzuführen. Nach einer Leberteilresektion oder Leberschädigung werden durch Wachstumsfaktoren und Zytokine mehrere Signalwege initiiert. Aus dem Magen-Darm-Trakt erreichen Proteine, wie das Lipopolysaccharid-bindendes-Protein, durch den portalvenösen Fluss die Leber und aktivieren die Kupfferschen Sternzellen. Weitere Faktoren wie Insulin aus dem Pankreas, T3 aus der Schilddrüse, EGF aus dem Duodenum, HGF aus den Kupfferschen Sternzellen sowie TNF-alpha und Interleukin 6 aus den Kupfferschen Sternzellen überführen die Hepatozyten über die G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus. Durch die Inhibierung des TGFβ-Signalweges wird

die Proliferation aufrechterhalten (Scotté et al., 1997; Stolz et al., 1999; Taub, 2004). Neben den Hepatozyten können hämatopoetische Stammzellen bei schweren und/oder chronischen Leberschädigungen durch Einwanderung in das Leberparenchym zur Leberregeneration beitragen (Kollet et al., 2003; Gehling et al., 2005; Dalakas et al., 2005). Des Weiteren sind wahrscheinlich die sogenannten „Oval cells“ an der Leberregeneration beteiligt. Diese Zellen finden sich in den terminalen Gallengängen und können in Hepatozyten oder Cholangiozyten differenzieren (Mavier et al., 2004; Gehling et al., 2005; Dalakas et al., 2005). Für den Wachstumsprozess wird sowohl die Proliferation des nicht-parenchymatösen Gewebes als auch eine ausreichende Gefäßversorgung unter Beteiligung von proangiogenen Faktoren benötigt (Michalopoulos et DeFrances, 1997; Drixler et al., 2002). Die genauen Mechanismen in diesem komplexen und abgestimmten Prozess sind nach wie vor nicht vollständig erforscht.

ESAs zeigen in nicht-hämatopoetischen Gewebe neuroprotektive und cardioprotektive Eigenschaften (Arcasoy et al., 2008). Dies wurde unter anderem auf eine anti-inflammatorische Wirkung zurückgeführt (Kumral et al., 2007). Es wurde daher die therapeutische Möglichkeit einer perioperativen Applikation von EPO zur Prävention eines postoperativen Leberversagens nach Phx postuliert (Sepodes et al., 2006; Bockhorn et al., 2008). Schmeding konnte in einem Ischämie-Reperfusionen-Modell der Ratte zeigen, dass EPO einen zytoprotektiven Effekt auf das Leberparenchym besitzt. In diesem Modell wurden nach portalvenöser EPO-Applikation signifikant erniedrigte Leberenzym-Werte sowie eine reduzierte Apoptose-Rate gemessen (Schmeding et al., 2008). Hiermit übereinstimmende Ergebnisse zeigte eine tierexperimentelle Arbeit zum medikamentös induzierten akuten Leberversagen im Mausmodell von Le Minh und Mitarbeiter. Die retrobulbäre intravenöse Applikation von DPO führte zu signifikant erniedrigten Leberenzymwerten und einer reduzierten Zellnekrose bzw. – apoptose (Le Minh et al., 2007). Die Arbeiten von Rupertus und Kollegen zeigten nach portalvenöser DPO-Applikation ebenfalls eine gesteigerte Proliferation und verringerte Apoptose 7 Tage nach Leberresektion. Klemm und Kollegen beschrieben einen negativen Effekt durch tägliche intravenöse rhuEPO-Gaben auf die Leberregeneration nach fünf Tagen im Rattenmodell. Sie führten diesen Effekt auf eine erhöhte TNF-alpha Ausschüttung zurück.

3.9 Einfluss der Leberregeneration auf Tumorzellen

In den oben aufgeführten klinischen Studien wurden nach Phx in einer Vielzahl der

klinischen Fälle intra- bzw. extrahepatische Tumorrezidive beschrieben (Fong et al., 1999; Yamamoto et al., 1999; Abdalla et al., 2004). Zur Klärung dieser Beobachtung folgten mehrere experimentelle Studien. Ob die Leberresektion und die damit einhergehende Leberregeneration einen Wachstumsschub von gastrointestinalen Tumorzellen initiieren, wird immer noch kontrovers diskutiert. Castillo und Kollegen beobachteten ein signifikant gesteigertes Überleben von Mäusen mit diffusen kolorektalen Lebermetastasen nach einer 40%igen Phx (Casillo et al., 1989). Die Arbeitsgruppe führte den beobachteten antiproliferativen Effekt auf eine gesteigerte Interferon-Produktion zurück (Doerr et al., 1989). Eine weitere Arbeit zeigte eine reduzierte Tumoraktivität eines hepatozellulären Karzinoms nach einer 60%igen Phx, wohingegen eine 30%igen Phx zur Stimulation des Tumorwachstums führte (Yokoyama et al., 2000). Die Mehrzahl der experimentellen Arbeiten berichtet jedoch von einem gesteigerten Tumorwachstum, sowohl nach 30%iger Phx als auch nach 70%iger Phx (van Dale et Galand, 1988; Mizutani et al., 1992; Panis et al., 1992; De Jong et al., 1995; Slooter et al., 1995; Picardo et al., 1998; Rashidi et al., 1999). Dies wird auf die vermehrte Bildung proliferationsteigernder und antiapoptotischer Wachstumsfaktoren unter der Leberregeneration zurückgeführt. Auch die erhöhten Konzentrationen von Chemokinen sowie die gesteigerte Produktion proangiogener Substanzen wurden als Ursache aufgeführt (Scotté et al., 1997; Picardo et al., 1998; Shimizu et al., 2005; Rupertus et al., 2010).

Effekte einer Phx auf extrahepatische Tumormanifestationen sind nicht eindeutig geklärt. Einerseits werden keinerlei Auswirkung auf subkapsuläre renale und retroperitoneale Metastasen eines hepatozellulären Karzinoms nach Phx beschrieben (De Jong et al., 1995). Andererseits zeigte Schindel und Grosfeld ein gesteigertes subkutanes Metastasenwachstum nach Phx (Schindel et Grosfeld, 1997). Die Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigen einen leichten proangiogenen, proliferativen Effekt nach 30%iger Phx und einen deutlichen Wachstumsstimulus nach 70%iger Phx auf extrahepatische Metastasen eines kolorektalen Karzinoms in der Maus (Rupertus et al., 2007). Weitere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass durch eine 70%ige Phx und portalvenöser Applikation von DPO das intrahepatische Anwachsen kolorektaler Karzinomzellen sowie deren Gefäßversorgung signifikant gesteigert wurde (Rupertus et al., 2010; Rupertus et al., 2012).

4 Ziel der Arbeit

Erythropoetin und sein Analogon DPO könnten einerseits aufgrund der anti-inflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften vielversprechende Therapeutika zur Prävention eines postoperativen Leberversagens nach ausgedehnter Leberresektion sein. Andererseits werden negative Effekte auf die chirurgische Therapie intrahepatischer Metastasen unter DPO postuliert. Da Untersuchungen zur Auswirkung von DPO nach Phx auf extrahepatische Metastasen des kolorektalen Karzinoms fehlen, wurde in Anlehnung an die bereits durchgeführten Tierexperimente unserer Arbeitsgruppe das Rückenhautkammer-Modell der Maus in Kombination mit dem Leberresektions-Modell der Maus zur Untersuchung dieses Sachverhaltes gewählt. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die Therapie mit DPO stimulierend auf das extrahepatische Anwachsen kolorektaler Tumorzellen auswirkt. Es soll ebenfalls das Anwachsen der Tumorzellen nach einer Kombination aus Phx und DPO-Gabe untersucht werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollen mögliche Effekte von DPO auf bereits etablierte extrahepatische Metastasen auch in Kombination mit einer Phx untersucht werden. Für diese Fragestellung werden das Tumorstadium, Migration, Infiltration, die Proliferationsrate, die Apoptoserate und die Ausbildung des tumorassoziierten Gefäßnetzwerkes analysiert.

5 Material und Methoden

5.1 Zellbiologische Methoden

5.1.1 Tumorzell-Linie

Das Tumormodell und die Operationstechniken wurden gemäß den vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe durchgeführt (Rupertus et al., 2007; Rupertus, 2008; Kollmar et al., 2010). Für die Experimente dieser Arbeit fanden Tumorzellen der Kolonkarzinomzell-Linie CT26.WT (ATCC CRL-2638, LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland) Verwendung. Diese Zell-Linie wurde durch die Induktion eines undifferenzierten Adenokarzinom des Kolons mittels N-Nitroso-N-Methylurethan gewonnen und ist syngene zur BALB/c-Maus. Eine Vielzahl von Studien zeigten die Eignung als syngenes Tumormodell mit guter Tumorgenität in der BALB/c-Maus (Wang et al., 1995; Tannenbaum et al., 1996; Zeelenberg et al., 2003; Kollmar et al., 2004, Kollmar et al., 2006, Rupertus et al., 2010; Rupertus et al., 2012). Die Anzucht der CT26.WT-Zellen erfolgte in der Zellkultur als Monolayer in RPMI-1640 Medium mit 2 mM L-Glutamin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 10% FCS (Fetal calf serum, FCS-Gold, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories GmbH) bei 37°C in einer humiden 5%igen CO₂-Atmosphäre (Rupertus, 2008).

5.1.2 GFP-Transfektion der CT26.WT-Zellen

Für die Versuche wurden Tumorzellen verwendet, die aktiv Green fluorescent protein (GFP) exprimieren und somit sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* mit einem speziellen Lichtschwellenfilter dargestellt werden können. Die Zellen mittels Phagen unter der Verwendung von CLONfectin (Clontech, Palo Alto, CA, USA) mit dem enhanced-GFP-Expressionsvektor pEGFP-N1 (Clontech) transfiziert (Kollmar et al., 2004). Es erfolgte die Selektion der erfolgreich transfizierten Tumorzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop durch Zusatz von Kanamycin. Nach Kultivierung der Zellen wurden diese bis zur weiteren Verwendung bei -180°C in Flüssigstickstoff kryokonserviert. Zur Vermeidung einer Zelllyse erfolgte der Zusatz von 10% DMSO (Sigma Aldrich Chemie GmbH) und 50% FCS. Zur erneuten Verwendung wurden die CT26.WT-GFP-Zellen in 37°C warmen

Wasser aufgetaut, in Kulturmedium überführt und zur Kultivierung in Petrischalen (Cellstar, 100/20 mm, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und inkubiert. Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank (Mikroflow Biological Safety Cabinet, Nunc Intermed, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt (Rupertus, 2008).

5.1.3 Kultivierung der Tumorzellen

Die CT26.WT-GFP Zellen wurden bei einer 70-80%igen Konfluenz passagiert. Zunächst erfolgte die Spülung mit steriler Phosphat gebufferter Kochsalzlösung (PBS). Zur Ablösung von den Kulturschalen wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin; 0,02% EDTA; PAA) versetzt. Der Ca^{2+} -bindende Komplexbildner EDTA wurde zur Verstärkung der Trypsinwirkung beigegeben. Dies ermöglicht eine Loslösung der Zellen ohne größeren Verlust an Oberflächenmolekülen. Nach Inkubation bei 37°C erfolgte die mikroskopische Kontrolle der fluoreszierenden Enzymwirkung zur Qualitätssicherung. Danach erfolgte die Neutralisation mit FCS haltigem Medium. Nach Zentrifugation (Universal 30 F, Hettlich, Tuttlingen, Deutschland) wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 ausgedünnt und bis zur nächsten ausreichenden Konfluenz kultiviert. Für die Experimente fanden nur CT26.WT-GFP Zellen der ersten drei Passagen nach Kryokonservierung Verwendung. Für die Präparation eines Zell-Pellets zur Tumorzellimplantation wurden die Zellen mit Trypsin aus der Kulturschale gelöst, mit PBS gewaschen und dreimal für jeweils drei Minuten bei 1600 U/min zentrifugiert, um eine entsprechend konzentrierte Zellsuspension zu erhalten.

5.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die zu implantierende Zellzahl wurde, wie in den vorangegangenen Arbeiten, auf 1×10^5 festgelegt und in entsprechender Technik bestimmt (Rupertus et al., 2007; Rupertus, 2008; Kollmar et al., 2010). Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 2 μl Zellsuspension aus dem Pellet entnommen, mit PBS verdünnt und 10%ige Trypanblau-Lösung (Sigma) beigegeben. Der Vitalfarbstoff Trypanblau kann die Zellmembran nur bei gestörter Membranintegrität durchdringen und wird daher zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer über der Fläche der 4 Eckquadrate (1 mm^2) ausgezählt. Diese ist aus 16 Kleinquadraten mit einer Seitenlänge von 0,25mm aufgebaut und ist 0,1mm hoch. Somit beträgt das Volumen über einem

Eckquadrat $0,1\text{mm}^3$ bzw. $0,1\mu\text{l}$. Zur Berechnung der Gesamtzellzahl einer Suspension wurde die folgende Formel verwendet:

Summe Zellzahl aller Quadrate/4 = Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat (Volumen $0,1\mu\text{l}$)

Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat $\times 10^4 = \text{Zellen/ml}$

Gesamtzellzahl $N_v = \text{Zellen/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen der Zellsuspension}$.

Die Zellzählung erfolgte unter einem inversen Lichtmikroskop (Leica DMIL, Solms, Deutschland) bei 100facher Gesamtvergrößerung. Die Lebendzellzahl wurde aus dem prozentualen Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl errechnet. Es wurden insgesamt 10 Zählungen durchgeführt und die zu implantierende Zellzahl wie in den vorangegangenen Studien auf 1×10^5 festgelegt (Rupertus, 2008; Rupertus et al. 2009).

5.2 Tierexperimentelles Modell

5.2.1 Versuchstiere und Haltung

Die Tierversuche wurden vom saarländischen Landesministerium für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung für Lebensmittel und Veterinärwesen genehmigt (Versuch 23/2007) und erfolgten unter Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes. Für die Versuchsreihe wurden 12-16 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von mindestens 21g verwendet. Die Tierhaltung erfolgte in Einzelkäfigen bei Raumtemperaturen von $22-24^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-65% mit einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus. Der freie Zugang zu Trinkwasser und Standard-Labornahrung (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) sowie die ungehinderte Bewegungsfreiheit in den Käfigen wurde gewährleistet. Das Körpergewicht, das Schlaf- und Fressverhalten und der Allgemeinzustand der Tiere wurden täglich kontrolliert und protokolliert.

5.2.2 Rückenhautkammer-Modell

Das Rückenhautkammer-Modell der Maus stellt ein etabliertes Verfahren zur wiederholten Analyse der Mikrozirkulation in Kombination mit der Intravital-Fluoreszenzmikroskopie bei relativ geringer Invasivität dar (Vajkoczy et al., 2000; Menger et al., 2002). Die Verwendung eigenfluoreszierender Tumorzellen, wie in diesem Modell mittels GFP-

Transfektion induziert, ermöglicht die Beurteilung der frühen Metastasenbildung einschließlich Tumorzellmigration und Angiogenese. Durch die Eigenfluoreszenz der Tumorzellen kann die Etablierung von Tumormetastasen und deren tumor-assoziierten Gefäßarchitektur ohne wiederholte Applikation von Farbstoffen untersucht werden (Jain et al., 2002; Sturm et al., 2003; Steinbauer et al., 2003).

Als Anästhetikum wurde zunächst eine Lösung, bestehend aus 7,5 Vol. % Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und 7,5 Vol. % Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Ketamin 100mg/ml, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) in 0,9%iger Kochsalzlösung hergestellt. Nach Gewichtsbestimmung der Versuchstiere erfolgte die gewichtsadaptierte intraperitoneale Injektion von je 10 ml/kg Körpergewicht (KG), entsprechend 90 mg/kg KG Ketamin und 15 mg/kg KG Xylazin. Dies ermöglicht eine tiefe Narkose über einen Zeitraum von 30-40 Minuten. Bei Bedarf konnten adaptierte Injektionen zur Aufrechterhaltung der Anästhesie vorgenommen werden.

Die Rückenhautkammer (RHK) besteht aus zwei flachen spiegelbildlichen Titanrahmen. Die Rahmen besitzen in der Mitte eine kreisrunde Aussparung für die Einlage eines Deckglases mit 11,9 Millimeter Durchmesser. An den Außenrändern befinden sich mehrere Ösen zur Fixierung am Gewebe. Der dem Operateur später abgewandte Titanrahmen wurde vor dem Eingriff mit drei um die zentrale Aussparung verlaufende Schrauben versehen und diese durch Muttern fixiert (Abb. 1A). Das benötigte Instrumentarium wurde mit den benötigten Kammerteilen 15 Minuten vor der Präparation bei 80° Celsius im Ultraschallbad gereinigt und anschließend mittels einer 70%-Ethanol-Lösung desinfiziert. Nach tiefer Anästhesie des Versuchstieres erfolgte die Rasur des Rückens mittels eines Tierhaarschneiders und eine anschließende gründliche Enthaarung der Rückenhaut mit einer Enthaarungscreme (asid-med Creme, ASID BONZ, Herrenberg, Deutschland). Das Tier wurde anschließend vorsichtig mit lauwarmem Wasser von möglichen Resten der Creme gereinigt. Nun wurde eine zentral verlaufende Hautfalte des Rückens mit beiden Händen unter Gegenlichtkontrolle hochgehalten und die prominenten Rückenhautgefäße parallel ausgerichtet. Die Hautfalte wurde durch einen jeweils kranial und kaudal angebrachten Haltefaden an einem Quergestänge gehalten. Der rückwärtige Rahmen wurde dann mittig auf die Hautfalte gelegt und kranial des Insertionsgebietes des M. retractor und kaudal entlang der Schulterbasis verlaufenden Versorgungsgefäße fixiert. Hierzu wurde zunächst die Rückenhaut mit zwei Haltenähten in den Ösen am Titanrahmen befestigt. Im nächsten Schritt wurde der Rahmen gegen die Hautfalte gedrückt und die Haut oberhalb der beiden am Unterrand der Kammer angebrachten

Schrauben inzidiert. Die beiden Schrauben wurden durch die eröffnete Haut geführt und mittels chirurgischer Klemmchen arretiert (Abb. 1B). Die abschließende Fixierung des Rahmens erfolgte mit zwei weiteren Nähten an der Oberseite der Kammer.

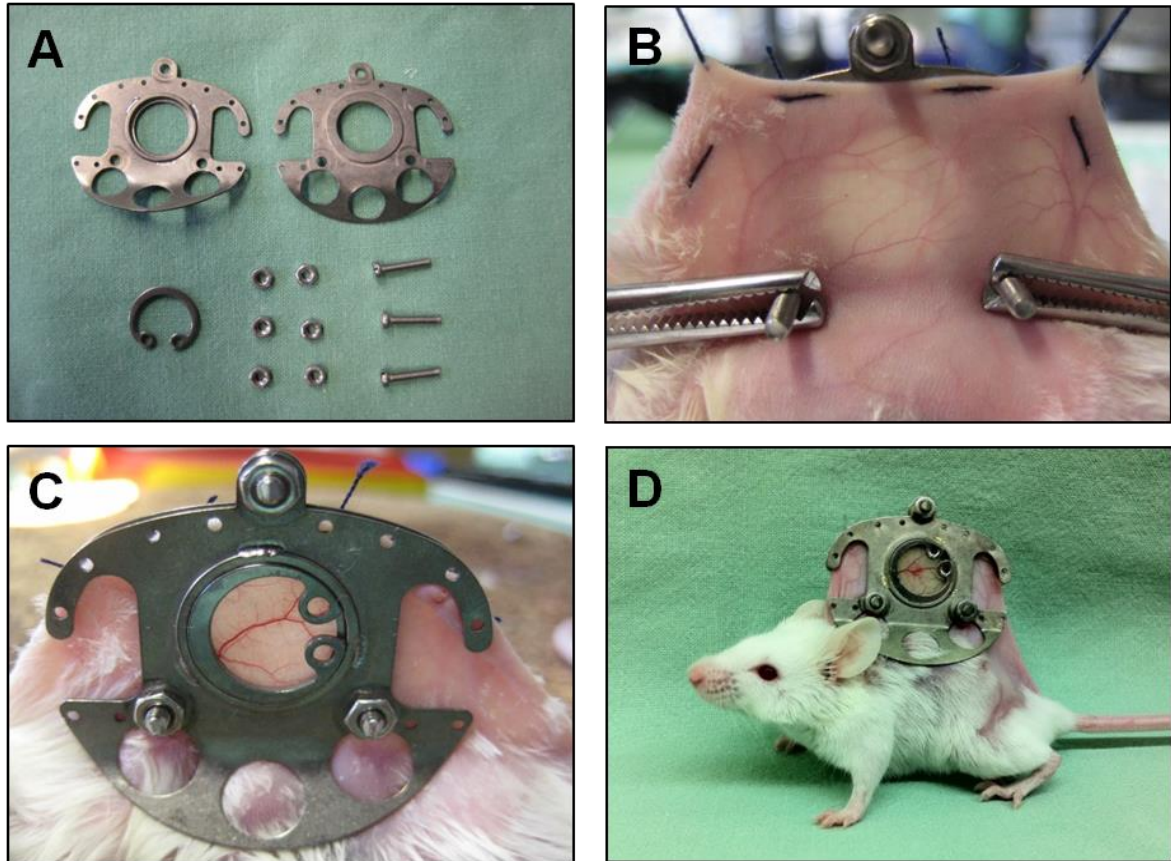


Abbildung 1: Präparation einer Rückenhautkammer der Maus

A: Übersicht der einzelnen Bestandteile einer Rückenhautkammer. **B:** Aufsicht auf den Operationssitus. Der rückwandige Titanrahmen wurde bereits am Oberrand der Hautfalte mittels Ligaturen fixiert. Am Unterrand wurden die beiden Schrauben nach Hautinzision mittels chirurgischer Klemmchen fixiert. Es zeigt sich im Gegenlicht die parallele Ausrichtung der Rückenhautgefäße. **C:** Rückenhautkammer nach Abschluss der Präparation. Die Rückenhautgefäße der Gegenseite sind durch das Deckglass zu erkennen. Diese hat einen Durchmesser von 11,9 Millimeter. **D:** Weibliche Balb/c Maus am 5. Tag nach Präparation der Rückenhautkammer.

Jetzt wurde im Gegenlicht der zu exzidierende Bereich, welcher der kreisrunden Aussparung der Kammer entsprach, mittels Permanentmarker eingezeichnet und die Haltefäden gelöst. Nach diesen Schritten konnte das Tier in Rechtsseitenlage unter dem OP-Mikroskop gelagert werden. Nun wurde im markierten Bereich Haut, Hautmuskulatur, Faszien-Fettgewebe und die beiden Schichten des M. retractor mittels Mikroschere exzidiert und so die abgewandte quergestreifte Hautmuskulatur freigelegt. Um eine Austrocknen des Gewebeareales zu verhindern sowie etwaige kleinere Koagel zu entfernen, erfolgte die Spülung mit 0,9%-Kochsalzlösung. Daraufhin wurde der vordere

Rahmen aufgesetzt und an den drei Schrauben mit Muttern festgeschraubt. Das Beobachtungsfenster wurde mit einem Deckglas versiegelt, wobei auf ein luftblasenfreies Anliegen des Glases am Gewebe geachtet wurde (Abb. 1C). Nach Fixierung des Deckglases durch einen Sprengring wurden die überstehenden Gewinde mit einem Seitenschneider gekürzt. Um ein Wiederherstellen der Normothermie zu unterstützen, wurden die Tiere nach der Operation in ihren Käfigen bis zum Wiedererwachen vor einer Rotlicht-Wärmelampe gewärmt. In der anschließenden 48-stündigen Erholungsphase wurde den Tieren freier Zugang zu Futter und Wasser sowie der gewohnten Schlaf-Wach-Rhythmus gewährt.

5.2.3 Leberresektion

Es wurde bei insgesamt 32 Versuchstieren eine Leberteilektomie von 70 Prozent des Ausgangsvolumens durchgeführt. Dies wurde mittels Resektion des linkslateralen und medialen Leberlappens erreicht (Rupertus et al., 2007). Die Operation wurde gemäß Versuchsprotokoll nach einem 48-stündigen Intervall zur Präparation der Rückenhautkammer unmittelbar vor Implantation der Tumorzellen bzw. am 5. Tag nach Tumorimplantation durchgeführt. Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Gabe von Ketamin und Xylazin anästhesiert. Die Lagerung erfolgte in Rückenlagen auf einer speziell mit einer Aussparung für die RHK versehenen Unterlage. Nach Rasur und Desinfektion des Abdomens erfolgte eine etwa 25 Millimeter lange mediane Laparotomie (Abb. 2A). Nach Eröffnung des Oberbauches wurden der linkslaterale und mediane Leberlappen nach Durchtrennung der ligamentären Haltestrukturen mobilisiert (Abb. 2A). Es wurde zunächst mit einem resorbierbaren, geflochtenen Faden (Vicryl® 5-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) der linkslaterale Leberlappen hilusnahe ligiert und mit einer Mikroschere exzidiert (Abb. 2B; 2C). Daraufhin wurde der mediane Leberlappen durch jeweils eine von rechts und links angelegte Ligatur von der Blutversorgung abgetrennt und ebenfalls entfernt (Abb. 2D). Es erfolgte die Spülung des Oberbauches mit 5 ml einer 37° Celsius warmen 0,9 % NaCl-Lösung bis zur Blutstille. Nach Kontrolle des Situs auf Bluttrockenheit wurde die Laparotomiewunde mit einem nicht-resorbierbaren Nahtmaterial (Prolene® 4-0, Ethicon, Norderstedt) allschichtig, fortlaufend verschlossen. Bei 32 Tieren, bei denen keine Phx durchgeführt wurde, wurde als Sham-Operation ebenfalls eine Laparotomie nach entsprechender Lagerung und Präparation durchgeführt. Es erfolgte Spülung des Oberbauches mit 5 ml einer 37° Celsius warmen 0,9 % NaCl-Lösung und allschichtige, fortlaufende Wundverschluss mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial

(Prolene® 4-0, Ethicon, Norderstedt). Auch nach diesem Eingriff wurden die Tiere bis zum Wiedererwachen durch eine Rotlicht-Wärmelampe gewärmt.

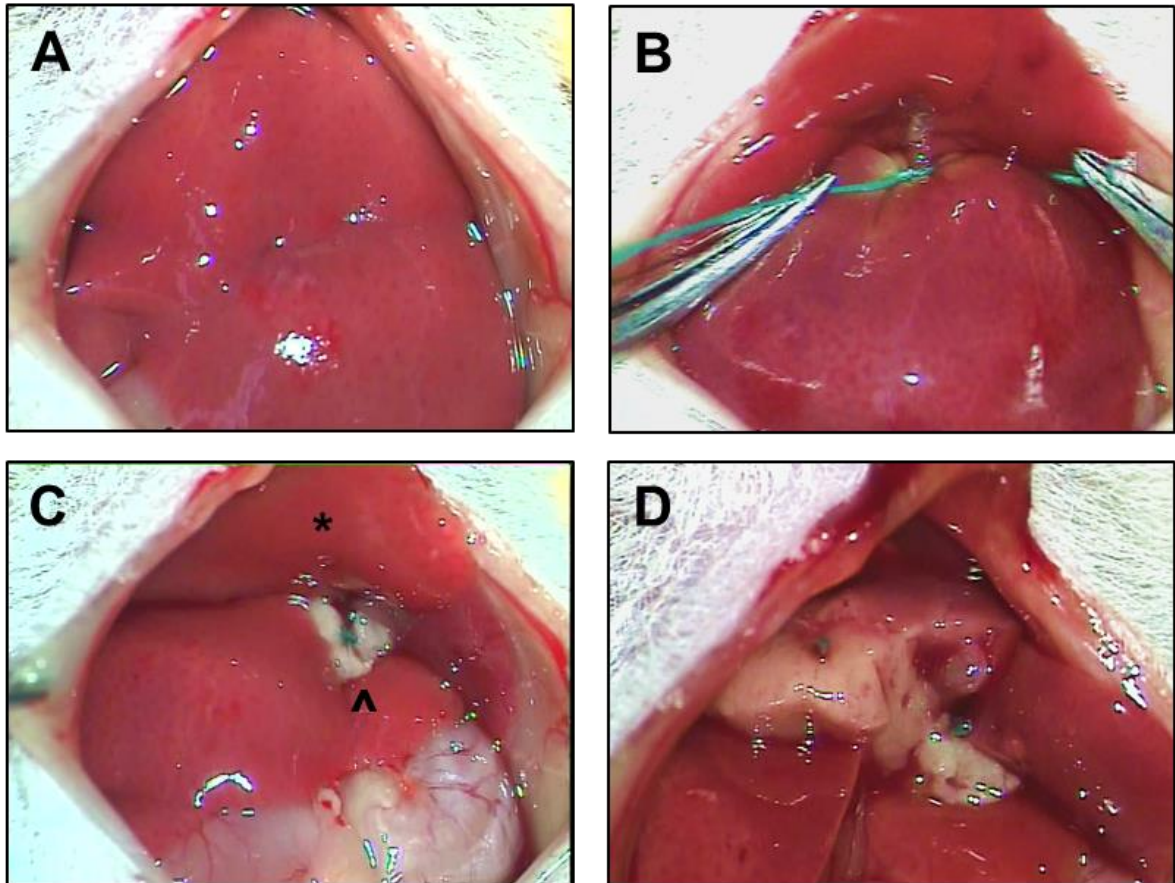


Abbildung 2: Leberresektion im Mausmodell

Arbeitsschritte während der Leberresektion. Mediane Laparotomie und seitliches Aufspannen der Bauchmuskulatur (**A**). Operationssitus nach Ligatur des linkslateralen Leberlappens (**B**). Situs nach Resektion des linkslateralen Leberlappens (**C**). Mittig ist die Ligatur und anämischen Reste des Leberlappens zu erkennen (**Pfeil**), rechts stellt sich der Magen dar. Es erfolgt im Anschluss die Ligatur und Resektion des nach oben weggeklappten medialen Leberlappens (**Stern**). Situs nach 70%iger Phx (**D**). Es erfolgten die ausgiebige Spülung mittels NaCl und der schichtweise Wundverschluss.

5.2.4 Implantation der Tumorzellen

Die GFP-CT26.WT Zellen wurden am Tag der Implantation in der unter 5.1.3 aufgeführten Methode zeitnah aufbearbeitet und in ein Eppendorfgefäß zur Aufbewahrung bis zur Implantation überführt. Für die Implantation wurden die Tiere auf einer Plexiglasbühne in Seitenlage fixiert, was eine waagerechte Ausrichtung der RHK gewährleistete. Nach Entfernung des Spannrings wurde das Deckglas unter Zuhilfenahme einer Nadel

angehoben und entfernt.

Anschließend wurden jeweils 2 µl der Tumorzellsuspension, entsprechend einer Zellzahl von 1×10^5 , mit einer Eppendorfpipette entnommen und mittig im oberen Drittel der Kammer implantiert. Bei diesem Schritt wurde darauf geachtet, dass die Implantation der Zellen zwischen die beiden prominenten Gefäßstämme der versorgenden Blutgefäße im Beobachtungsfeld erfolgte. Im nächsten Schritt erfolgte der Verschluss der Kammer mit einem neuen Deckglas, wobei auf ein erneutes luftblasenfreies Anlegen des Gewebes an das Glas geachtet wurde. Nach Fixierung mittels eines Spannrings wurde unmittelbar darauf die erste intravital-mikroskopische Aufnahme durchgeführt. Der Zellhaufen sollte sich idealerweise als möglichst rund, dicht und homogen darstellen. Es wurde auf eine gleichbleibende Qualität der Tumorzellimplantation geachtet. Dafür wurde der entstandene Zellhaufen streng hinsichtlich der Gütekriterien Streuung und Größe beurteilt. Tiere mit möglicherweise zu stark verdünnte Zellhaufen oder durch Luftblasen verstreute Tumorzellen, welche von der beschriebenen Methode abwichen, wurden gegebenenfalls aus der Studie ausgeschlossen (Kollmar et al., 2010).

Um ein Auskühlen zu verhindern wurden die Tiere nach Abschluss der Aufnahmen vor einer Rotlichtquelle platziert und gewärmt. Eine Rekonvaleszenz-Phase von 5 Tagen bis zur nächsten IVM-Untersuchung wurde eingehalten.

5.2.5 Behandlung mit DPO

Die Behandlung der Tiere erfolgte je nach randomisierter Gruppeneinteilung mit dem Erythropoetin-Analogon DPO. Dieses aus Ovarialzellen des Hamsters gewonnene Molekül besitzt zwei zusätzliche Zuckerreste. Aufgrund dieser Kohlenhydratketten verfügt DPO über eine längere terminale Halbwertszeit als rekombinantes humanes EPO und damit eine höhere in vivo Aktivität. Die Spezifität für den EPO-R zeigte sich unter dieser Konfiguration des Moleküls unverändert (Overbay et Manley, 2002).

Das Medikament wurde in Anlehnung an die vorangegangenen Experimente in einer Dosierung von 10 µg/kg KG einmalig verabreicht (Le Minh et al., 2007; Rupertus et al., 2010). Allerdings erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Applikation systemisch und nicht wie zuvor portalvenös. Für eine vereinfachte und kontrollierte Dosierung wurde das Präparat mit PBS zu einem Volumen von 80 µl mit einer Konzentration von 0,0025 µg/l verdünnt. Zunächst wurden 40 µl der Lösung intravenös in den retrobulbär gelegenen Venenplexus des linken Auges appliziert. Die erfolgreiche Gabe zeigte sich in einer leichten Protrusion des Augapfels ohne Flüssigkeitsaustritt während der Applikation. Um

die gewünschte verlängerte Wirkdauer des Agens zu erzielen, wurden weiter 40 µl der Lösung zudem als subkutanes Depot in die linke Flanke des Tieres injiziert. Den Tieren der Sham-Gruppen wurde auf die gleiche Weise jeweils 40µl PBS appliziert.

5.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

5.3.1 Mikroskopietechnik

Im Rahmen von *in vivo* –Studien ist die Intravitale Fluoreszenzmikroskopie eine seit vielen Jahren etablierte Methode. Sie ermöglicht eine Aufzeichnung mittels Video-System von physiologischen und pathologische Vorgängen in Echtzeit. Die IVM findet unter anderem Anwendung zur Erforschung von Mechanismen der Wundheilung, Ischämie-/Reperfusionsschaden oder Tumorentwicklung (Vajkoczy et al., 2000; Menger et al., 2003; Kollmar et al., 2006; Kollmar et al., 2010).

Für die Mikroskopie wurde ein modifiziertes Zeiss Axio-Tech-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen Deutschland) mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberdampflampe verwendet. Die Helligkeitsregulierung der Lampe wird durch ein FluoArc-Steuersystem (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) gesteuert. Zu den einzelnen Zeitpunkten wurden die Untersuchungen in Epiilluminations-Technik mit einem integrierten Blaulichtfilter (450-490 nm Exzitations- und >520 nm Emissionswellenlänge) durchgeführt. Mittels Videokamera (FK 6990, COHU, Prospective Measurements Inc., San Diego, CA, USA) erfolgte die Übertragung an ein Recordersystem (Samsung München, Deutschland) und auf DVDs (Imation Europe BV, Niederlande) für die Offline-Analyse aufgezeichnet.

Für die Analysen wurden folgende Objektive verwendet:

- 4x: UPlanFI, Olympus, Japan, n.A. 0,13
- 10x: Plan Neofluar, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, n.A. 0,30
- 20x / Wasserimmersion: Achroplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, n.A. 0,50

5.3.2 Mikroskopieprotokoll

Die erste Intravitalmikroskopie erfolgte unmittelbar nach Implantation der Tumorzellen unter Verwendung der 4x und 10x Objektive an Tag 0. Sie diente der Beurteilung der Ausgangsgröße des Tumors, der Zellmorphologie und der Dokumentation möglicher artifizieller Zellverschleppungen durch die Implantationstechnik. Weitere intravitalmikroskopische Untersuchungen erfolgten an den Tagen 5, 8, 11 und 14 nach Tumorzell-

Implantation und beinhalteten Übersichtsaufnahmen mit dem 4x Objektiv, sowie Aufnahmen mit dem 10x und 20x Objektiv in aufgeführten Arealen (Abb 3). Die Tiere wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt mit der oben beschriebenen Methode narkotisiert. Die Lagerung auf einer Plexiglasbühne in Seitenlage gewährleistete eine waagrechte Ausrichtung des Sichtfeldes. Die Fixierung durch einen Faden an der Schrauben der RHK verhinderte Bewegungsartefakte durch Atmung und Herzschlag. Die Platte wurde auf den Objektträger des Mikroskops positioniert und das Objektiv auf das Sichtfenster der RHK ausgerichtet.

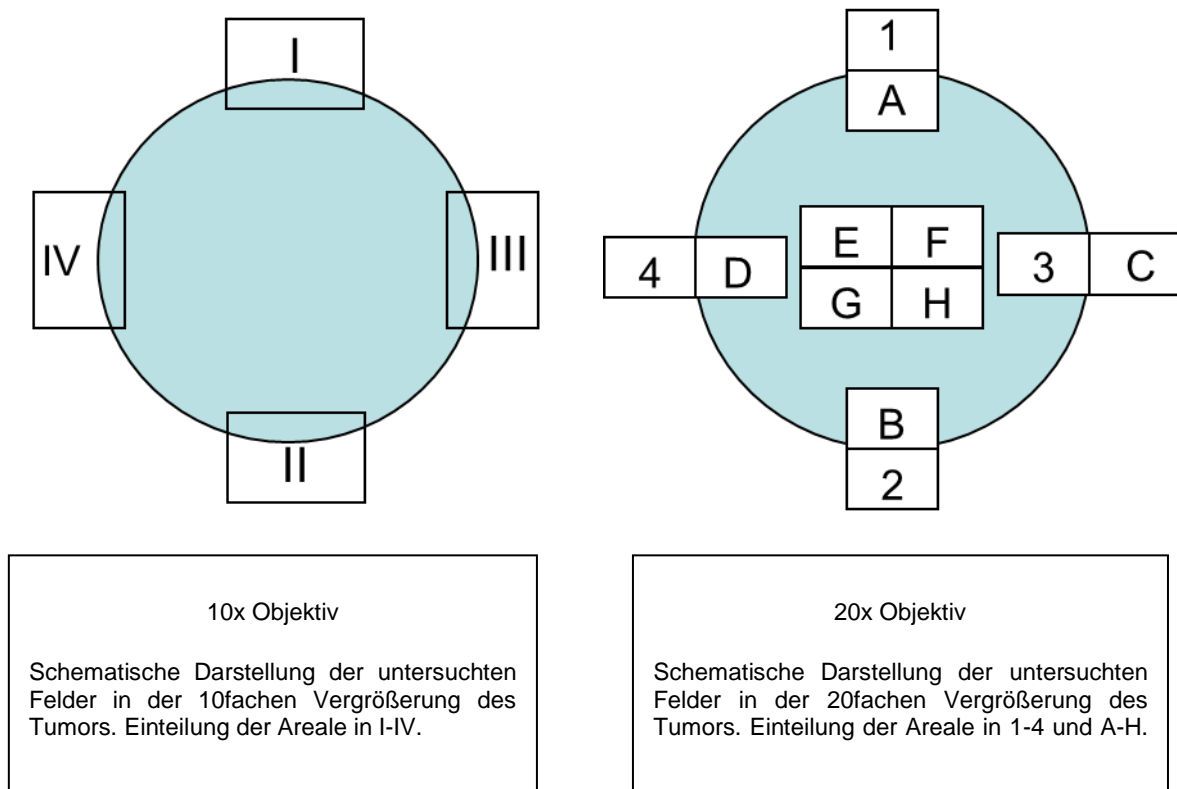


Abbildung 3: Anordnung der Beobachtungsareale

5.3.3 Computerassistierte Auswertung der Intravitalmikroskopie

Die Analyse der auf DVDs aufgezeichneten intravitalmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit einer speziell hierfür entwickelten Bildanalyse-Software (CAPIMAGE, Zeintl Software Engineering, Heidelberg, Deutschland) unter Wiedergabe auf einem DVD-Abspielgerät (Panasonic, Osaka, Japan). Die Software erlaubt es unter einem individuellen Benutzerprofil, die auf das jeweilige Experiment abgestimmten Auswertungsparameter zu definieren und abzuspeichern. Dies garantierte zu jedem Zeitpunkt eine Auswertung unter standardisierten Bedingungen.

Als Parameter zur Quantifizierung des Tumorwachstums wurde die Tumorfläche [mm²] gewählt. Zu ihrer Bestimmung erfolgte die Umrandung des Areales, welches in der 4fach vergrößerten Aufnahme von den GFP-positiven Zellen eingenommen wurde. Das Tumorareal wurde als das vollständig von Tumorzellen bedeckte Areal der Rückenhautkammer definiert. Als Tumorrand wurde der letzte Bereich festgelegt, welcher sich unter dem 10fach und 20fach Objektiv als kompakte Tumormasse darstellte, unter den durch seine Zellmasse kein normales Rückenhautgewebe fokussiert werden konnte. Die Tumorzellmigration, also die Tendenz der Tumorzellen sich in das umliegende Gewebe auszubreiten, ist ein wichtiger Malignitätsfaktor. Um die Migration zu bestimmen wurde zunächst in den Feldern I-IV (Abb. 3) die jeweils am weitesten vom Tumorrand entfernte CT26.WT-Zelle ermittelt und deren Abstand vom Tumorrand gemessen [µm]. Zusätzlich wurden unter 20facher Vergrößerung in den Feldern 1-4 (Abb.3) mit Hilfe einer durchsichtigen Schablone diejenigen Zellen ausgezählt, welche sich innerhalb eines definierten, repräsentativen 0,05mm² großen Areals in unmittelbarer Umgebung des Tumorrandes befanden.

Zur Bestimmung der Tumor-induzierten Angiogenese wurde ein zuvor etablierter Score angewendet, der die Beobachtungsfelder I-IV der 10fachen Vergrößerung danach beurteilte, ob in ihnen neugebildete Gefäßformationen zu erkennen waren. Ein positives Feld wurde mit 1 Punkt, eine negatives mit 0 Punkten gewertet (Kollmar et al., 2006; Kollmar et al., 2010). Um diesen Untersuchungsparameter detaillierter zu erfassen, wurden des Weiteren die Felder A-H (Abb.3) in der 20fachen Vergrößerung hinsichtlich der Gefäßdichte [cm/cm²] ausgewertet. Hierbei repräsentierten die Felder A-E Areale des Tumorrandgebietes, die Untersuchungsfelder F-H Areale das Tumorzentrum. Zur Bestimmung der Gefäßdichte innerhalb des Tumors wurden alle perfundierten Gefäße eines Feldes in ihrer Gesamtlänge nachgezeichnet.

Um die Entwicklung der Mikrozirkulation der Tumoren zu beurteilen, wurden die mittleren Durchmesser der neu gebildeten Blutgefäße im Tumorrandbereich sowie im Tumorzentrum analysiert. Hierzu wurden in den Feldern A-H die Durchmesser [µm] von jeweils 5 Kapillaren unterschiedlichen Kalibers ausgewählt, die in ihrer Gesamtheit repräsentativ für den entsprechenden Bildausschnitt waren. Die Bestimmung des Durchmessers erfolgte senkrecht zum Gefäßverlauf.

5.4 Probenentnahme und Konservierung

Im Anschluss an die letzte Intravitalmikroskopie nach 14 Tagen wurden die Tiere unter dem OP-Mikroskop in Rückenlage positioniert. Es erfolgte die Eröffnung des Abdomens und Darstellung der Vena cava. Diese wurde mit einer Kanüle punktiert und 500 bis 800 µl Blut aspiriert. Hiervon wurden 80 µl Blut zur Blutbildanalyse verwendet. Die restliche Blutprobe wurde mit 3000 Umdrehungen für 4 Minuten bei 4° Celsius zentrifugiert und das Serum bei -80°Celsius in Flüssigstickstoff konserviert. Darauf wurde das Tier mit einer Überdosis Pentobarbital-Natrium (Narcoren[®], Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) eingeschläfert. Die Leber des Tieres wurde darauf von möglichen Adhäsionen gelöst und im Gesamten exzidiert. Ihr Gewicht wurde umgehend mit einer Feinwaage (Ohaus Corporation, Florham Park, USA) ermittelt. Abschließend wurde das Areal der RHK um den Tumor ausgeschnitten und mittels mehrerer Nadeln auf eine Korkplatte aufgespannt. Dann wurde das Tumoreal mittels Skalpells halbiert und zwei glatte Schnittländer geschaffen. Die eine Hälfte wurde zur weiteren histologischen Aufarbeitung in 4% Formalin-Lösung konserviert, die andere Hälfte zur Kryokonservierung in das Gefriermedium Tissue-Tek (Sakura Finetek, Waldbüttelbrunn, Deutschland) eingebettet und bei -80 °Celsius eingefroren.

5.5 Histologie und Immunhistochemie

Die histologische und immunhistochemische Aufarbeitung und Auswertung erfolgte in gleicher Technik und Methodik wie in den vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe (Rupertus et al., 2007; Rupertus, 2008; Kollmar et al., 2010). Es erfolgte eine Entwässerung der in Formaldehyd fixierten Gewebeproben, welche darauf in Paraffin eingebettet wurden. Mittels eines Mikrotoms wurden von den erstarrten Paraffinblöcken Präparate mit einer Schnittdicke von 5µm angefertigt. Als Standardfärbung wurde die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung nach Mayer gewählt. Die HE-Präparate dienten zur Beurteilung der Infiltration der Tumorzellen. Deren invasives Wachstum wurde quantifiziert, indem der Anteil der infiltrierten, angrenzenden Muskelschicht ins Verhältnis zur Gesamtlänge der Tumorausbreitung im Anschnitt gesetzt wurde. Als infiltriertes Areal wurden solche Abschnitte der Muskularis gewertet, welche zu mehr als 50 Prozent in ihrer Gesamtbreite durch Tumorzellen durchsetzt oder destruiert waren.

Als Proliferationsmarker in der immunhistochemischen Darstellung wurde PCNA

(proliferating cell nuclear antigen) gewählt. Wie in den vorangegangenen Studien erfolgte die Anfärbung apoptotischer Prozesse durch gespaltene Caspase-3. Nach der Entparaffinierung erfolgte die Anfärbung von PCNA und gespaltene Caspase-3 mit Hilfe der indirekten Immunoperoxidase-Technik. Um endogene Peroxidasen sowie uncharakteristischen Bindungsstellen zu blockieren, erfolgte die Inkubierung der Schnitte zuerst mit 3%igem Wasserstoffperoxid und 2%igem normalem Ziegenserum. Zur Primärantikörpermarkierung von PCNA wurde ein monoklonaler Maus-Anti-Pan-PCNA-Antikörper (PC10; 1:50; DakoCytomation, Hamburg, Deutschland), von gespalteener Caspase-3 ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus-Caspase-3-Antikörper (ASP175, 1:50; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Dieser detektiert nur das kurze Fragment (17/19 kD) der gespaltenen und dadurch aktivierten Caspase-3. Das intakte und somit inaktive Molekül bietet dem Antikörper keine Bindungsstelle. Als Sekundärantikörper für die Peroxidasereaktion wurden biotinylierte Ziegen-Anti-Maus- und Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper (1:200; LSAB 2 System HPR, DakoCytomation) verwendet. 3,3'-Diaminobenzidin (DakoCytomation) diente als Chromogen. Nach der Gegenfärbung nach Mayer mit Hämalaun erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung.

Die semiquantitative Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus BX60, Japan). Das Ausmaß der Infiltration wurde anhand der HE-Färbungen ausgewertet. Hierzu wurde im Anschnitt der maximalen Tumorausdehnung die Basis des Tumors ausgemessen. Die darunterliegende Muskularis-Schicht wurde auf Bereiche mit Destruktion und Infiltration durch die Tumorzellen hin ausgewertet. Dieser Anteil wurde ins Verhältnis zur Gesamtlänge des Tumors gesetzt. In der Analyse der immunhistochemischen Präparate wurden unter 175facher Vergrößerung pro Präparat 5 HPFs der Tumorperipherie und 5 HPFs des Tumorzentrums ausgewertet. In der Analyse der Proliferationsrate wurde der Anteil PCNA-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl errechnet. Im Fall der Apoptose wurde der Durchschnitt aus der Anzahl an Caspase-3 positiven Zellen in 10 HPF errechnet.

5.6 Tierexperimentelles Protokoll

5.6.1 Versuchsgruppen und zeitlicher Ablauf

Im Folgenden sind der zeitliche Ablauf der Untersuchungen (Abb.4) und die einzelnen Versuchsgruppen (Tab. 1) zur Veranschaulichung dargestellt.

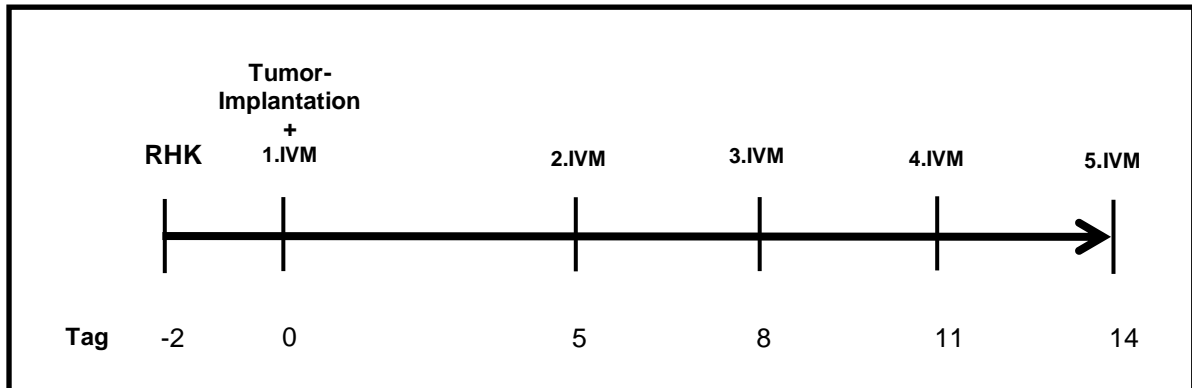


Abbildung 4: Versuchsablauf im Zeitstrahl

Versuchsabschnitt	Gruppe	Phx	Zeitpunkt der Leberresektion	Agens	Zeitpunkt der Applikation
la	1	nein	-	80µl PBS	Tag 0
la	2	nein	-	10µg/kg KG DPO	Tag 0
lb	3	ja	Tag 0	80µl PBS	Tag 0
lb	4	ja	Tag 0	10µg/kg KG DPO	Tag 0
IIa	5	nein	-	80µl PBS	Tag 5
IIa	6	nein	-	10µg/kg KG DPO	Tag 5
IIb	7	ja	Tag 5	80µl PBS	Tag 5
IIb	8	ja	Tag 5	10µg/kg KG DPO	Tag 5

Tabelle 1: Versuchsgruppen in der Übersicht

5.6.2 Versuchsabschnitt Ia

An allen Tieren dieser Gruppen wurde nach Anlage einer RHK und 48-stündiger Rekonvaleszenz eine Laparotomie mit anschließender Spülung des Abdomens mit 37°Celsius warmer Kochsalzlösung und fortlaufendem Wundverschluss durchgeführt. Wie unter 5.2.4 beschrieben, wurden jeweils 1×10^5 Tumorzellen in die RHK implantiert. Den Tieren der Gruppe 1 (n=8) wurde als neutrale Kontrollgruppe nach Beendigung der ersten IVM-Aufnahme 80µl PBS zu gleichen Teilen retrobulbär und subkutan injiziert. In Gruppe 2 (n=8) sollte der Einfluss von DPO auf das extrahepatische Anwachsen von CT26.WT-GFP-Tumorzellen untersucht werden. Diesen Tieren wurde direkt nach Implantation der Tumorzellen und anschließender IVM 10µg/kg KG DPO auf die oben beschriebene Applikationsweise verabreicht.

5.6.3 Versuchsabschnitt Ib

Im zweiten Teil des Versuchsabschnittes I wurden die Auswirkungen einer DPO-Gabe nach 70%iger Leberresektion auf das Anwachsen von CT26.WT-GFP-Tumorzellen untersucht. Hierfür wurden alle Tiere einer Teilresektion der Leber, wie unter 5.2.3 beschrieben, unterzogen. Diesen Tieren wurden ebenfalls im Anschluss an die Operation Tumorzellen implantiert und eine erste IVM-Aufnahme durchgeführt. Die Tiere aus Gruppe 3 (n=8) dienten als Kontrolle und wurden wie die Tiere der Gruppe 1 mit 80µl PBS behandelt. Den Tieren der Gruppe 4 (n=8) wurde direkt nach Beendigung der ersten IVM-Untersuchung DPO (10µg/kg KG) auf die oben beschriebene Applikationsweise verabreicht.

5.6.4 Versuchsabschnitt IIa

Im zweiten Versuchsabschnitt sollte die Auswirkung von DPO bzw. die Leberresektion nach DPO-Gabe auf etablierte extrahepatische Tumormetastasen des kolorektalen Karzinoms untersucht werden. Da bei dieser Tumorzelllinie bereits nach fünf Tagen post implantationem ein Anwachsen mit Gefäßneubildung zu beobachten ist, wurde in diesem Modell von einer etablierten Tumormetastase ab Tag 5 ausgegangen.

Anhand der Gruppe 6 sollten Erkenntnisse über den Einfluss von DPO auf bereits etablierte, extrahepatisch Metastasen gewonnen werden. Daher wurde diesen Tieren erst 5 Tage nach Tumorzellimplantation einmalig DPO wie bereits beschrieben appliziert.

Durch einen Therapiebeginn 5 Tagen nach Aussaat der Tumorzellen, konnten diese im Gewebe der RHK anwachsen und zunächst mit einem unbeeinflussten Wachstum und Zellstoffwechsel beginnen. Den Tieren der Gruppe 5 wurde als Kontrolle 80µl PBS an Tag 5 des Experiments verabreicht.

5.6.5 Versuchsabschnitt IIb

In diesem Versuchsteil sollte der Einfluss einer Leberresektion mit anschließender DPO-Gabe auf bereits etablierte extrahepatisch Metastasen der CT26.WT-GFP-Tumorzellen untersucht werden. Es wurde Gruppe 7 (n=8) als neutrale Kontrollgruppe herangezogen. Am 5. Tag nach Implantation wurde zunächst eine 70%ige Leberresektion durchgeführt und nach Ende der zweiten IVM 80µl PBS auf oben beschriebene Weise appliziert. Die Tiere der Gruppe 8 (n=8) wurden ebenfalls am 5. Tag nach Implantation leberreseziert und erhielten anschließend als Therapie in beschriebener Weise 10µg/kg KG DPO.

5.7 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Software Pakets SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) erstellt. Die Werte wurden stets als Mittelwert \pm SEM angegeben. Nach der Prüfung auf Normalverteilung und Homogenität der Varianz in den verschiedenen Versuchsgruppen, wurden Unterschiede zwischen den Gruppen mittels Varianzanalyse (ANOVA) bestimmt. Anschließend erfolgte für den individuellen Gruppenvergleich ein entsprechender post hoc Test (Bonferroni) mit Korrektur des α Fehlers. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

6 Ergebnisse

6.1 Wirkung von DPO auf das Anwachsen extrahepatisch implantierter CT26.WT-Zellen

6.1.1 Tumorwachstum

Zu allen Untersuchungspunkten wurde die Flächenausdehnung der Tumorzellen mit Hilfe der IVM aufgezeichnet. Hierbei wurde die Fläche innerhalb der Rückenhautkammer bestimmt, die vollständig von GFP-positiven Zellen bedeckt war (Abb. 5A; B). Es wurde bei allen Tieren ein Anwachsen der CT26.WT-Zellen nach Implantation beobachtet. In beiden Gruppen zeigten die Tumorzellen während des Untersuchungszeitraumes einen progredienten Flächenzuwachs (Abb. 5).

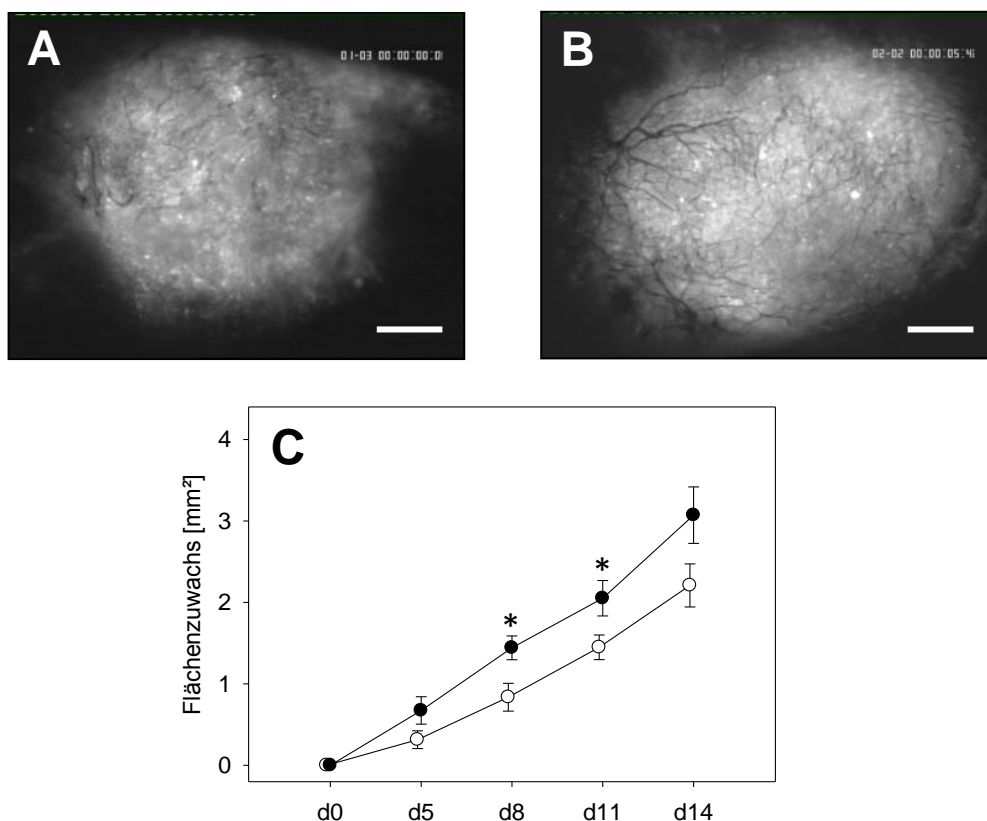


Abbildung 5: Tumorwachstum von CT26.WT-Zellen nach DPO Gabe

A, B: Intravitalmikroskopische Fluoreszenzaufnahme in Blaulicht Epi-Illumination GFP-transfizierter CT26.WT-Tumorzellen in der Rückenhaut einer Balb/c Maus am 14. Tag des Experiments. **A:** Fluoreszenzaufnahme des Tumors eines Kontrolltieres **B:** Aufnahme des Tumors eines an Tag 0 mit DPO behandelten Tieres. **C:** Quantitative Darstellung des Flächenzuwachses in mm². Am Tag 0 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe (weiße Kreise) 80 µl PBS und die behandelten Tiere 10µg/kg KG DPO (schwarze Kreise).

Angaben in MW ±SEM; *p<0,05 vs. Kontrolle. Maßstab A;B = 500µm

Die mit DPO- behandelten Tiere der Gruppe 2 zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum ein gesteigertes Tumorwachstum. An Tag 8 und Tag 11 war die Flächenzunahme des Tumoreales gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. An Tag 14 betrug die Flächenzunahme in der DPO-Gruppe $3,07 \pm 0,35 \text{ mm}^2$ gegenüber der Kontrolle mit $2,26 \pm 0,24 \text{ mm}^2$. Ein statistisches Signifikanzniveau wurde an diesem Tag allerdings nicht erreicht.

6.1.2 Angiogenese

Die Analyse der Angiogenese zeigt, dass Tiere der DPO-behandelten Gruppe früher und in mehr Arealen des Tumorrandes neue Gefäße ausbildeten als die der Kontrollgruppe. So finden sich bereits an Tag 11 in 50% der beobachteten Felder Gefäßausprossungen nach DPO-Behandlung. Dagegen zeigte die Kontrollgruppe erst an Tag 14 des Experiments in der Hälfte der Areale Zeichen neugebildeter Gefäße (Abb. 6).

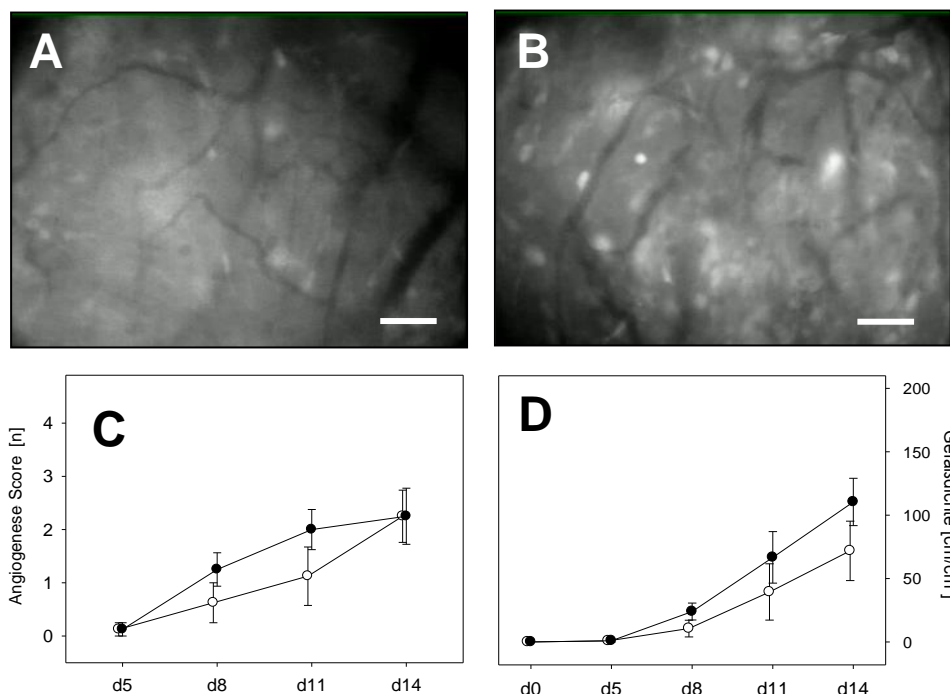


Abbildung 6: Angiogenese und Gefäßdichte von CT26.WT-Zellen nach DPO-Gabe

A, B: Intravitalmikroskopische Fluoreszenzaufnahme am 14. Tag des Experiments mit Darstellung neugebildeter Tumorgefäße. **A:** Fluoreszenzaufnahme eines Tumorrandareals eines Tieres der Kontrollgruppe. **B:** Aufnahme des Tumorrandgebietes eines mit DPO behandelten Tieres. **C:** Quantitative Darstellung des Angiogenese-Scores der an Tag 0 mit DPO behandelten Gruppe (schwarze Kreise) und der Kontrollgruppe (weiße Kreise). **D:** Quantitative Darstellung der Gefäßdichte in Tumorealen im Randgebiet. Am Tag 0 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe (weiße Kreise) 80 μl PBS und die behandelten Tiere 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG DPO (schwarze Kreise). MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Maßstab A;B = 100 μm

Dieser Unterschied erwies sich statistisch jedoch als nicht signifikant. In beiden Gruppen waren in 7 von 8 Tieren Gefäßneubildungen innerhalb des Beobachtungszeitraumes fluoreszenzmikroskopisch darstellbar. Bei den Tieren der DPO-behandelten Gruppe konnte in den Arealen des Tumorrandes eine leicht gesteigerte Zunahme der neugebildeten Gefäße beobachtet werden. Die Gefäßdichte war ab Tag 8 in der DPO-behandelten Gruppe gegenüber der Kontrolle ohne statistische Signifikanz erhöht (Tag 14: 110 ± 18 cm/cm² vs. 72 ± 23 cm/cm²). Eine derart erhöhte Gefäßdichte konnte bei der Auswertung des Tumorzentrums nicht gefunden werden (hier nicht dargestellt). Die Kontrollgruppe zeigte im Tumorzentrum am Tag 14 mit einer Gefäßdichte von 83 ± 30 cm/cm² keinen Unterschied zur DPO-behandelten Gruppe mit 82 ± 26 cm/cm². In beiden Gruppen zeigte sich in den 14 Tagen des Experiments eine progrediente Abnahme des durchschnittlichen Gefäßdurchmessers von $15 \mu\text{m}$ auf $10 \mu\text{m}$.

6.1.3 Migration

Die Migration der Zellen wurde ab dem 5. Tag nach Implantation analysiert. Die Tumorzellen waren durch ihre Eigenfluoreszenz und der spindelförmigen Konfiguration des Zytoplasmas gut vom Normalgewebe abgrenzbar (Abb. 7).

Beide Gruppen zeigten bereits ab Tag 5 nach Implantation eine Migration an den Tumorrändern. Die zurückgelegte Strecke der Tumorzellen variierte über den Beobachtungszeitraum zwischen $257 \mu\text{m}$ und $367 \mu\text{m}$. Die Zellen der DPO-behandelten Gruppe entfernten sich über den gesamten Untersuchungszeitraum im Durchschnitt $50 \mu\text{m}$ weiter vom Tumorrand als die Kontrolle. Die Gruppen unterschieden sich in der Anzahl der migrierenden Zellen, zwischen 10-18 GFP-positive Zellen pro $0,05 \text{ mm}^2$, zu keinem Beobachtungszeitpunkt.

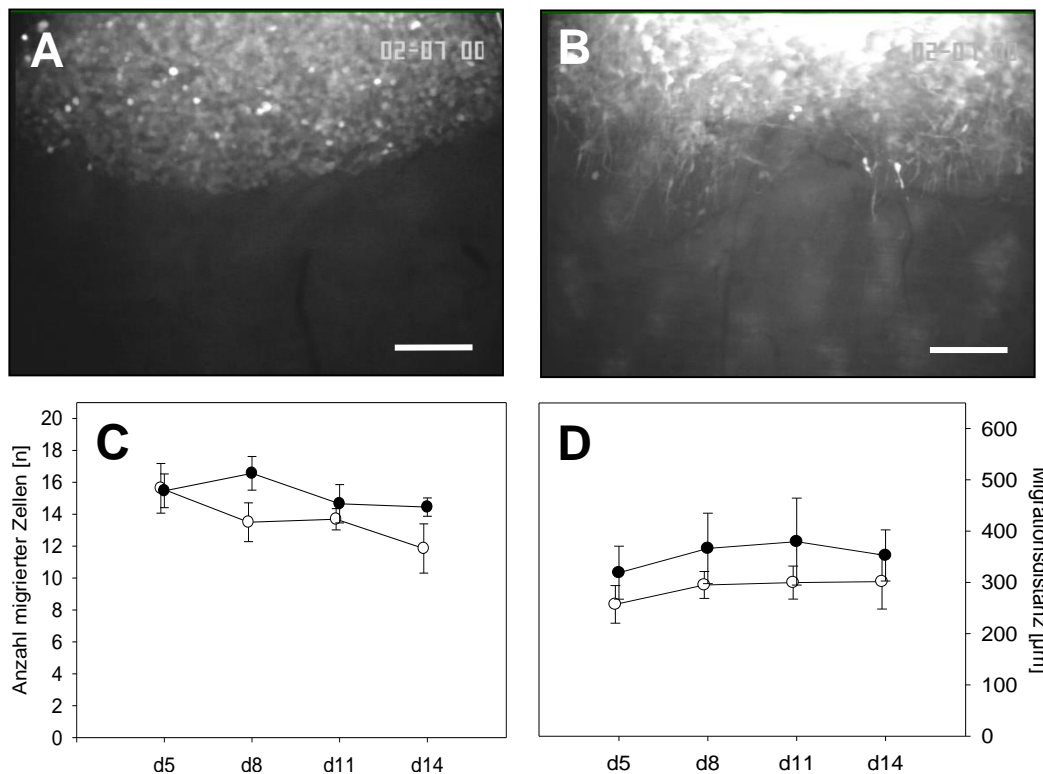


Abbildung 7: Migration von CT26-Zellen nach DPO Gabe

A, B: Intravitalmikroskopische Fluoreszenzaufnahme am Tumorrand. **A:** Fluoreszenzaufnahme eines Tieres der Behandlungsgruppe am Tag der Implantation. Die Tumorzellen erscheinen rund. **B:** Aufnahme desselben Tumorrandgebietes an Tag 5 des Experiments. Die spindelförmigen Zellen am Rand beginnen mit der Migration. **C:** Quantitative Darstellung der Zellanzahl pro 0,05 mm² an den Tumorrändern. **D:** Quantitative Darstellung der durchschnittlich zurückgelegten Distanz in µm. Am Tag 0 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe (weiße Kreise) 80 µl PBS und die behandelten Tiere 10µg/kg KG DPO (schwarze Kreise). MW ±SEM; *p<0,05 vs. Kontrolle Maßstab A;B = 250µm

6.1.4 Infiltration

Maligne Tumore definieren sich unter anderem durch ihre Eigenschaft, natürliche Gewebegrenzen zu überwinden und destruktiv in das umliegende Gewebe einzuwachsen. Bei der Beurteilung der HE-Schnitte der Tumore wurde die Länge der infiltrierten Muskularis zum Verhältnis der Gesamtlänge der Tumorbasis gesetzt. Die Gruppen unterschieden sich mit einem infiltrierten Anteil von 16±6% in der Kontrolle und 21±9% in der DPO-behandelten Gruppe nicht signifikant voneinander.

6.1.5 Proliferation

Die Auswertung der PCNA-gefärbten Präparate zeigte in der Kontrolle ein Anteil von 57±5% positiv-gefärbter Tumorzellen als Durchschnittswert aus 10 HPFs, zu je 5 Feldern

aus Tumorzentrum und Tumorrand. Die Analyse der DPO-behandelten Gruppe ergab einen Anteil von $66\pm 6\%$ PCNA-positiven Zellen. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant.

6.1.6 Apoptose

Die Auswertung der Caspase-3 positiver Zellen erfolgte nach der in 5.5 beschriebenen Methode. Die Auswertung von je 10 HPFs pro Tumor ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Wert von 0,4 Caspase-3 positiven Zellen pro HPF wurde nie überschritten.

6.1.7 Lebergewicht und Blutanalysen

Nach erfolgreicher IVM an Tag 14 wurden allen Tieren Blutproben aus der Vena cava inferior entnommen. Nach dem Tod des Tieres wurde das gesamte Lebergewebe entnommen und das Gewicht mittels Feinwaage bestimmt. Die Leber wog im Durchschnitt in der Kontrollgruppe $1,0\pm 0,03\text{g}$, in der Behandlungsgruppe $1,1\pm 0,05\text{g}$.

Es zeigten sich signifikant erhöhte Thrombozytenwerte nach der Behandlung mit DPO an Tag 0 im Vergleich zur Kontrolle ($963\pm 55\cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. $713\pm 91\cdot 10^3/\mu\text{l}$; $p < 0,05$). Die Anzahl der Erythrozyten sowie der Hämoglobingehalt waren nach der Behandlung mit DPO leicht aber nicht signifikant erhöht. Die Zahl der Leukozyten befand sich in beiden Gruppen im physiologischen Normbereich.

6.1.8 Tabellarische Zusammenfassung Abschnitt Ia

Gruppe	Tumorstadium	Angiogenese	Migration/ Infiltration	Proliferation	Apoptose
1 vs. 2	↑↑	↑	-	-	-

Tabelle 2: Ergebnisse Abschnitt Ia in der Übersicht

Zusammenfassender Überblick über die Ergebnisse nach DPO Behandlung an Tag 0 des Experiments. Die „↑↑“ beziffern signifikante erhöhte Unterschiede zwischen Kontrolle und DPO. Einfache „↑“ zeigen eine beobachtete Tendenz ohne statistische Signifikanz an. Die „-“ beziffern keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

6.2 Wirkung von DPO auf das Anwachsen extrahepatisch implantierter CT26.WT-Zelle nach 70%iger Leberresektion

6.2.1 Tumorwachstum

Im Versuchsabschnitt Ib wurde der Effekt einer DPO-Gabe auf das Anwachsen von GFP-transfizierten CT26.WT-Tumorzellen nach einer 70%igen Leberresektion untersucht. Es zeigte sich in allen Gruppen eine progrediente Zunahme der Tumorfläche über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abb. 8). Wurden den Tieren am Tag der Leberresektion DPO appliziert, konnte ein verstärktes Tumorwachstum über den gesamten Verlauf des Experiments beobachtet werden. Diese Differenz in der Zunahme der Tumorfläche war während des gesamten Versuches aufgrund einer größeren Standardabweichung nicht signifikant. An Tag 14 des Experiments hatte sich die Tumorfläche der Gruppe 4 durchschnittlich um $3,28 \pm 0,60 \text{ mm}^2$ gegenüber $2,58 \pm 0,23 \text{ mm}^2$ der Gruppe 3 vergrößert.

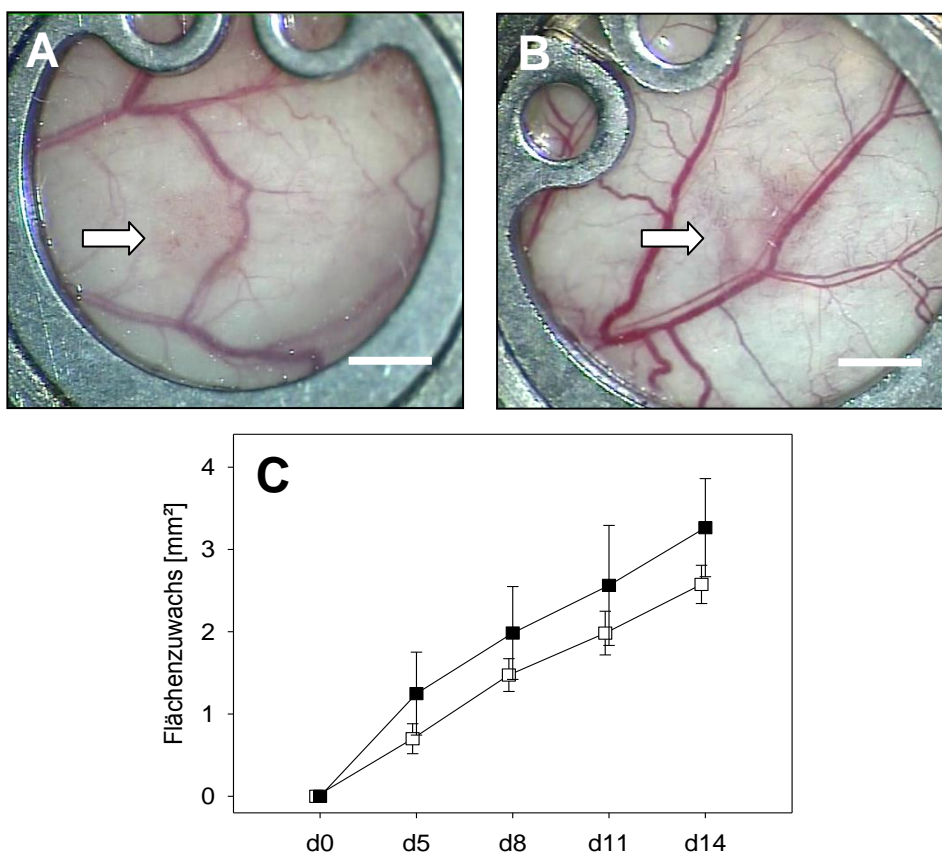


Abbildung 8: Tumorwachstum von CT26.WT-Zellen nach Phx und DPO-Gabe

A, B: Stereomikroskopische Aufnahmen einer Rückenhautkammer 14 Tage nach Tumorzellimplantation. Die Tumore eines Kontrolltieres (**A**) und eines DPO-behandelten Tieres (**B**) grenzen sich durch die Gefäßstruktur vom Normalgewebe ab (**Pfeile**). **C:** Quantitative Darstellung des Tumorflächenzuwachses in mm². Am Tag 0 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe nach Phx (weiße Quadrate) 80 µl PBS und die behandelten Tiere nach Phx 10 µg/kg KG DPO (schwarze Quadrate). MW ± SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle. Maßstab A; B = 2 mm

6.2.2 Angiogenese

Die Analyse der Gefäßneubildung innerhalb des Tumorgewebes erfolgte analog zu Versuchsabschnitt Ia. Es konnten über den Beobachtungszeitraum in 7 von 8 Tieren der Kontrollgruppe Tumorgefäße detektiert werden. In allen 8 Tieren der Gruppe 4 wurden neugebildete Gefäße festgestellt. In der Beurteilung der Randzonen des Tumors anhand des aufgeführten Angiogenese-Scores zeigte sich eine beschleunigte Ausbildung neuer Gefäße bereits ab Tag 8 nach der unmittelbaren Gabe von DPO nach Leberresektion im Vergleich zu den Tumoren der Gruppe 3. Der Unterschied war an Tag 11 signifikant. Diese Beobachtung bestätigte sich auch in der Auswertung der Gefäßdichte (Abb.9).

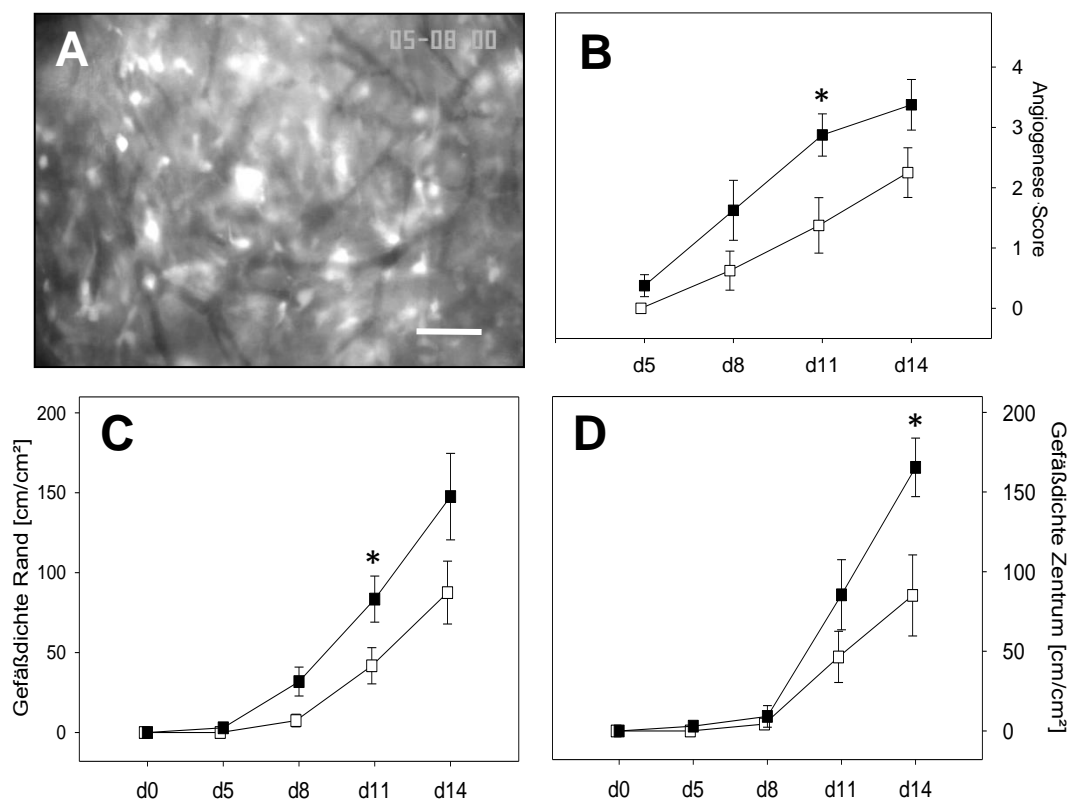


Abbildung 9: Angiogenese von CT26.WT-Zellen nach Phx und DPO-Gabe

A: IVM Aufnahme im Tumorzentrum eines Tieres nach Phx und DPO-Behandlung an Tag 14. **B:** Quantitative Darstellung des Angiogenese-Scores. **C, D:** Quantitative Darstellung der Gefäßdichte im Randgebiet (**C**) und im Tumorzentrum (**D**). Am Tag 0 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe (weiße Quadrate) nach Phx 80 μ l PBS und die behandelten Tiere (schwarze Quadrate) nach Phx 10 μ g/kg KG DPO. MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle Maßstab A= 100 μ m

Am 11. Tag des Experiments war der Unterschied zwischen den Gruppen im Randgebiet statistisch signifikant. Am 14. Tag des Experiments betrug die mittlere Gefäßdichte im

Tumorrandgebiet 88 ± 19 cm/cm² (Phx) und 147 ± 27 cm/cm² (Phx/DPO) mit einer erhöhten Standardabweichung ohne statistische Signifikanz. Die Gefäßdichte im Tumorzentrum war nach 14 Tagen mit 165 ± 18 cm/cm² in der Behandlungsgruppe statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle mit 85 ± 25 cm/cm² erhöht. Die Auswertung der Gefäßdurchmesser zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen.

6.2.3 Migration

In allen Gruppen bildeten die Tumorzellen in gleicher Häufigkeit Ausläufer an den Tumorrändern. Die Zelldichte der spindelförmigen Ausläuferzellen betrug durchschnittlich 13 bis 17 Tumorzellen pro 50µm² an den Tumorrändern in beiden Gruppen. Die Ausläuferzellen der DPO-behandelten Gruppe waren zu allen Untersuchungszeitpunkten weiter vom jeweiligen Tumorrand entfernt. Die zurückgelegte Distanz war am Tag 5 nach Implantation im Durchschnitt mit 331 ± 19 µm (DPO) vs. 218 ± 33 µm (Kontrolle). Dieser Unterschied war in der Analyse nicht signifikant.

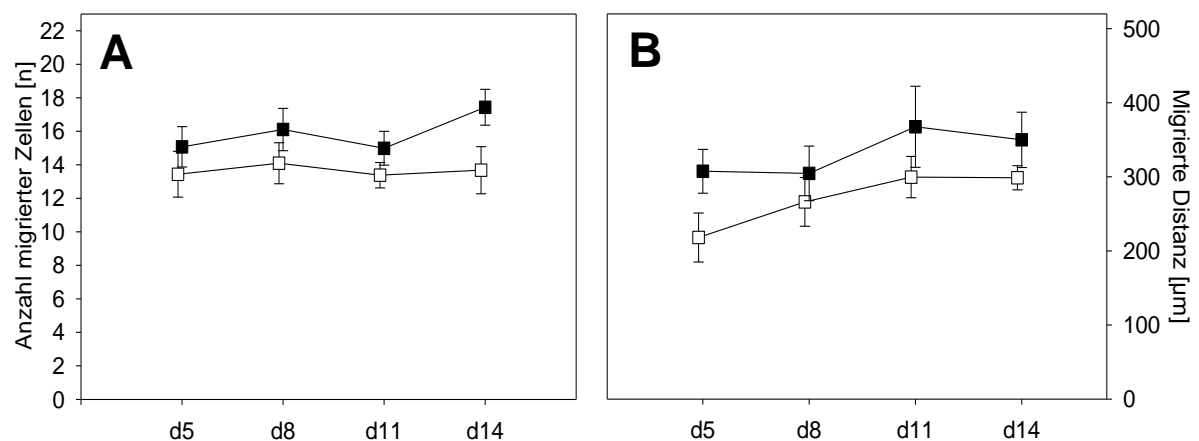


Abbildung 10: Migration von CT26.WT-Zellen nach Phx und DPO-Gabe

A: Quantitative Darstellung der Zellanzahl pro 0,05 mm² an den Tumorrändern. **B:** Quantitative Darstellung der durchschnittlich zurückgelegten Distanz der Tumorausläufer. Am Tag 0 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe (weiße Quadrate) nach Phx 80 µl PBS und die behandelten Tiere nach Phx 10µg/kg KG DPO (schwarze Quadrate).

MW±SEM; *p<0,05 vs. Kontrolle

6.2.4 Infiltration

Die Auswertung der Infiltration wurde kongruent zu Versuchsabschnitt Ia durchgeführt. In der Kontrollgruppe war die an die Tumorbasis angrenzende Muskularis zu $23\pm 7\%$ durch die CT26.WT-GFP-Zellen infiltriert. In den Behandlungsgruppen infiltrierten die Tumorzellen die Muskularis in Gruppe 4 (DPO) zu $37\pm 12\%$. Dieser Unterschied war in der statistischen Auswertung nicht signifikant (Abb. 11C).

6.2.5 Proliferation

Der Anteil PCNA-positiver Tumorzellen war mit 65 Prozent in der Auswertung der Tumorzellproliferation beider Gruppen nahezu identischer (Abb. 11D).

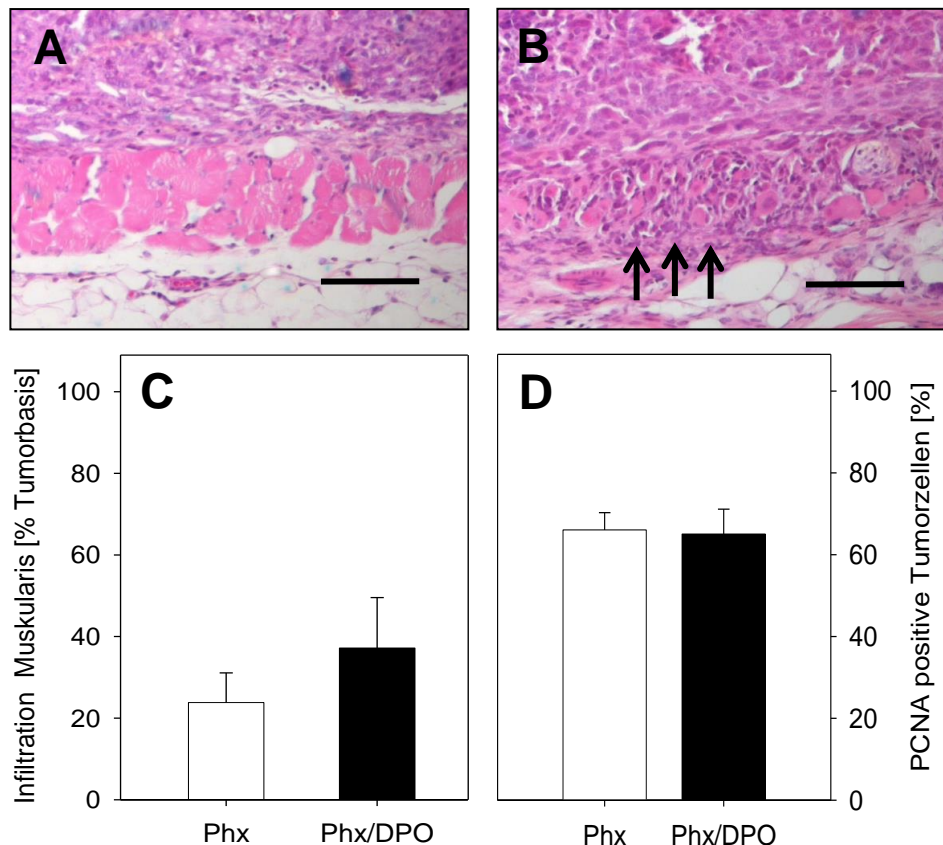


Abbildung 11: Infiltration und Proliferation von CT26.WT-Zellen nach Phx und DPO-Gabe

A, B: HE gefärbte Tumore im Anschnitt mit angrenzender Muskularis im Lichtmikroskop. Ein Tumor eines Tieres der Kontrollgruppe (**A**). Ein Tumor eines Tieres der Behandlungsgruppe (**B**) mit Zeichen der Destruktion und Infiltration der Muskularis (Schwarze Pfeile). **C:** Quantitative Darstellung des Anteils der infiltrierten Muskularis-Schicht. **D:** Quantitative Darstellung des prozentualen Anteils PCNA positiver Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Tumorzellen. Am Tag 0 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe (weißer Balken) nach Phx 80 µl PBS und die behandelten Tiere nach Phx 10 µg/kg KG DPO (schwarzer Balken). MW ± SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle. Maßstab A;B = 100 µm

6.2.6 Apoptose

In der Auswertung der Caspase-3-positiven Zellen war zwischen den Gruppen hinsichtlich der Expression dieses Apoptosemarkers kein Unterschied zu beobachten. In den Tumoren der DPO-Gruppe waren im Durchschnitt 0,18 Zellen pro HPF positiv, bei Zellen der Kontrolle waren es $0,27 \pm 0,16$ pro HPF.

6.2.7 Lebergewicht und Blutanalysen

Das durchschnittliche Lebergewicht an Tag 14 betrug in der Kontrollgruppe $1,13 \pm 0,04$ g und nach DPO-Gabe $1,08 \pm 0,04$ g. Die Blutbildanalyse ergab in den Proben nach DPO-Gabe eine erhöhte Anzahl an Thrombozyten mit $951 \pm 95 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ im Vergleich zur Kontrolle mit $798 \pm 88 \cdot 10^3/\mu\text{l}$. Die Menge an Erythrozyten und der Hämoglobingehalt waren in der Behandlungsgruppe nur leicht erhöht. In beiden Gruppen wurde eine physiologische Anzahl von Leukozyten in den Blutproben gemessen.

6.2.8 Tabellarische Zusammenfassung des Abschnittes Ib

Gruppe	Tumorwachstum	Neoangiogenese	Migration/ Infiltration	Proliferation	Apoptose
3 vs. 4	↑	↑↑	↑	-	-

Tabelle 3: Ergebnisse Abschnitt Ib in der Übersicht

Zusammenfassender Überblick über die Ergebnisse nach PHX und DPO-Gabe an Tag 0 des Experiments. Die „↑↑“ beziffern signifikant erhöhte Unterschiede zwischen Kontrolle und DPO. Einfache „↑“ zeigen eine beobachtete Tendenz ohne statistische Signifikanz an. Die „-“ beziffern keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

6.3 Wirkung von DPO auf etablierte extrahepatische CT26.WT-Tumormetastasen

6.3.1 Tumorwachstum

Der zweite Versuchsabschnitt untersuchte die Wirkung einer DPO-Gabe auf bereits etablierte extrahepatische Metastasen des kolorektalen Karzinoms. Beide Gruppen zeigten nach der Sham-Operation und Applikation von 80 μ l PBS bzw. 10 μ g/kg DPO an Tag 5 des Experiments eine nahezu identische Größenzunahme (Abb. 12). An Tag 14 betrug die Flächenzunahme in der DPO-Gruppe 2,55 \pm 0,21 mm² gegenüber der Kontrolle mit 2,16 \pm 0,31 mm² ohne ein statistisches Signifikanzniveau zu erreichen.

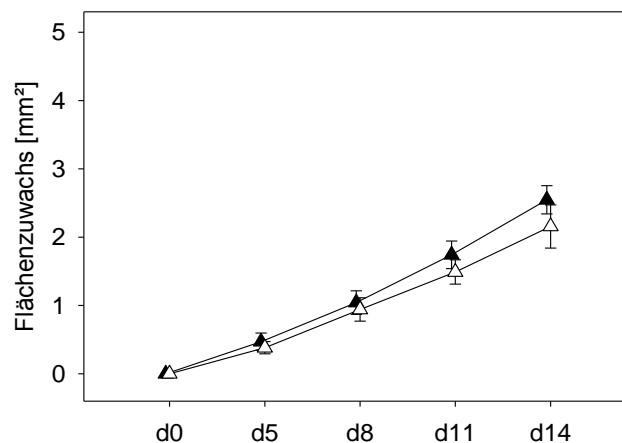


Abbildung 12: Tumorwachstum in etablierten extrahepatischen Metastasen nach DPO-Gabe

Quantitative Darstellung des Flächenzuwachses in mm². Am Tag 5 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe (weiße Dreiecke) 80 μ l PBS und die behandelten Tiere 10 μ g/kg KG DPO (schwarze Dreiecke). MW \pm SEM; *p<0,05 vs. Kontrolle.

6.3.2 Angiogenese

In der Auswertung des Angiogenese-Scores konnten in der DPO-Behandlungsgruppe zu Beginn in mehr ROIs Anzeichen neugebildeter Gefäße innerhalb des Tumors beobachtet werden (2,0 \pm 0,6 vs. 0,8 \pm 0,5). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Im Verlauf näherten sich beide Gruppen an und erreichten nach 14 Tagen die gleiche Punktzahl (Abb. 13).

Hinsichtlich der Gefäßdichte innerhalb des Tumors zeigten beide Gruppen einen progredienten Zuwachs an Gefäße. Die Kontrolle bildete im Mittel eine Gefäßdichte von

92 ± 25 cm/cm² und die Behandlungsgruppe 129 ± 26 cm/cm² am Rand aus. Die Auswertung der Gefäßdurchmesser ergab Werte zwischen 9 und 18 µm ohne Unterschiede zwischen den Gruppen.

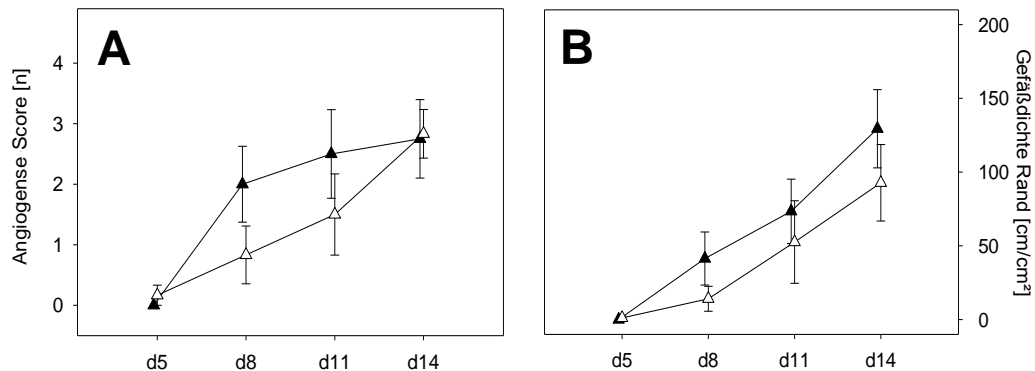


Abbildung 13: Angiogenese und Gefäßdichte in etablierten extrahepatischen Metastasen nach DPO-Gabe

A: Quantitative Darstellung des Angiogenese-Scores. **B:** Quantitative Darstellung der Gefäßdichte in Tumorarealen im Randgebiet. Am Tag 5 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe (weiße Dreiecke) 80 µl PBS und die behandelten Tiere 10 µg/kg KG DPO (schwarze Dreiecke).

MW \pm SEM; *p<0,05 vs. Kontrolle.

6.3.3 Migration

Eine Migration der Tumorzellen an den Tumorrändern konnte bei allen Tieren beobachtet werden. Die durchschnittliche Distanz lag über den Beobachtungszeitraum zwischen 200 bis 400 µm ohne statistisch signifikante Unterschiede. Die Anzahl migrierter Zellen variierte im Mittel zwischen 11 und 15 Zellen ohne statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

6.3.4 Infiltration

In der Auswertung der histologischen Präparate konnten keine Unterschiede bzgl. der Muskularis-Infiltration festgestellt werden. In der Kontrolle waren im Mittel 16% und in der Behandlungsgruppe 19% an der Tumorbasis infiltriert.

6.3.5 Proliferation

Die Auswertung der PCNA-gefärbten Präparate zeigte in der Kontrolle einen Anteil von $55 \pm 8\%$ positiv-gefärbter Tumorzellen. Die Analyse der DPO-behandelten Gruppe ergab

einen Anteil von PCNA-positiven Zellen von $72\pm 1\%$. Dieser Unterschied war mit $p=0,057$ knapp statistisch nicht signifikant.

6.3.6 Apoptose

Die Auswertung von jeweils 10 HPFs hinsichtlich der Apoptoserate innerhalb der Tumore mittels Caspase-3-Färbung ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Im Mittel zeigten sich 0,2 bis 0,3 Zellen pro HPF Caspase-3 positiv.

6.3.7 Lebergewicht und Blutanalysen

Es bestand kein Unterschied im Lebergewicht nach 14 Tagen zwischen der DPO-Gruppe ($1,11\pm 0,06$ g) und Kontrolle ($1,02\pm 0,03$ g). In Bezug auf die Blutbildanalyse war lediglich der Hämoglobingehalt war nach DPO-Gabe ohne Signifikanz erhöht ($13,2\pm 0,5$ g/dl vs. $11,5\pm 1,2$ g/dl).

6.3.8 Tabellarische Zusammenfassung des Abschnittes IIa

Gruppe	Tumorwachstum	Angiogenese	Migration/ Infiltration	Proliferation	Apoptose
5 vs. 6	-	↑	-	↑	-

Tabelle 4: Ergebnisse Abschnitt IIa in der Übersicht

Zusammenfassender Überblick über die Ergebnisse nach DPO-Gabe an Tag 5 des Experiments. Die „↑↑“ bezeichnen signifikante Unterschiede. Einfache „↑“ zeigen eine beobachtete Tendenz ohne statistische Signifikanz an. Die „-“ bezeichnen keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

6.4 Wirkung von DPO auf etablierte extrahepatische CT26.WT-Tumormetastasen nach 70%iger Leberresektion

6.4.1 Tumorwachstum

Zur Beurteilung der Auswirkungen von DPO nach Phx auf bereits etablierte extrahepatische Metastasen wurden zwei Versuchsgruppen an Tag 5 leberteilreseziert. Die Kontrollgruppe wurde einmalig an Tag 5 nach Implantation der Tumorzellen mit 80µl PBS behandelt. Gruppe 8 erhielt als Behandlungsgruppe an Tag 5 DPO. Es zeigten beide Gruppen ein vergleichbares stetiges Tumorwachstum. Am Ende des Experiments betrug die durchschnittliche Flächenzunahme der Behandlungsgruppe $2,30 \pm 0,47 \text{ mm}^2$ und der Kontrollgruppe $2,19 \pm 0,47 \text{ mm}^2$.

6.4.2 Angiogenese

In der Kontrollgruppe konnten bei 6 von 8 Tieren neu gebildete Gefäße innerhalb des Tumoreals beobachtet werden. In 7 von 8 Tieren der DPO-behandelten Gruppe wurden neue Gefäßformationen im Tumorgebiet festgestellt. Die Auswertung des Angiogenese-Scores zeigte in der Behandlungsgruppe eine gesteigerte Gefäßausproßungsrate in den Tumorrandgebieten. Die Tumore bildeten an Tag 11, also 6 Tage nach DPO-Gabe, durchschnittlich in $1,8 \pm 0,5$ Beobachtungsfeldern des Tumorrandgebietes Zeichen einer Gefäßneubildung im Vergleich zu durchschnittlich $1 \pm 0,4$ Feldern in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (Abb. 14).

Die Analyse der Gefäßdichte zeigte eine erhöhte Gefäßdichte in den Tumoren nach DPO-Gabe. Diese war an Tag 11 mit ca. 50 cm/cm^2 in Rand und Zentrum gegenüber ca. 23 cm/cm^2 in der Kontrollgruppe doppelt so hoch. Auch an Tag 14 war die Gefäßdichte der Behandlungsgruppe mit durchschnittlich $72,8 \pm 22,5 \text{ cm/cm}^2$ im Randgebiet und $83,0 \pm 21,5 \text{ cm/cm}^2$ im Zentrum im Vergleich zur Kontrolle mit $36,7 \pm 15,3 \text{ cm/cm}^2$ am Rand und $43,4 \pm 19,0 \text{ cm/cm}^2$ im Zentrum doppelt so hoch. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

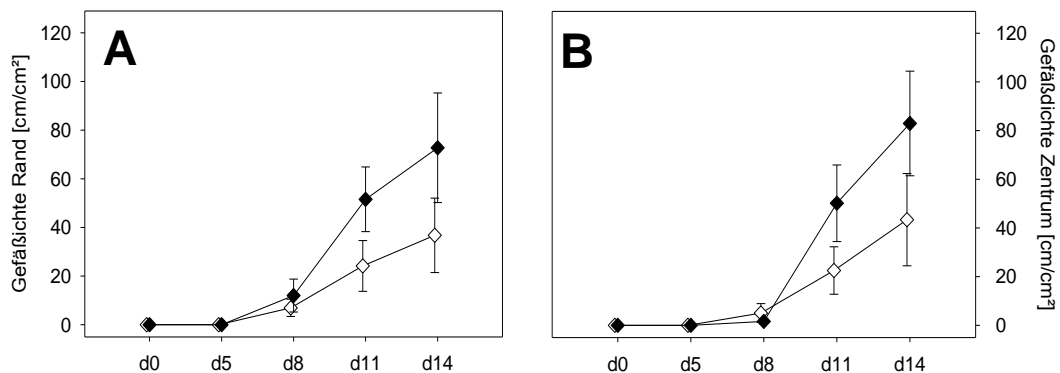


Abbildung 14: Angiogenese in etablierten Metastasen nach Phx und DPO-Gabe

A, B: Quantitative Darstellung der Gefäßdichte in Tumorebenen im Randgebiet (**A**) und Tumorzentrum (**B**). Am Tag 5 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe (weiße Raute) nach Phx 80 μ l PBS und die behandelten Tiere nach Phx 10 μ g/kg KG DPO (schwarze Raute). MW \pm SEM; * p <0,05 vs. Kontrolle

6.4.3 Migration

Die beiden Gruppen unterschieden sich hinsichtlich der Anzahl der migrierenden Zellen am Tumorrand und deren zurückgelegten Distanz nicht voneinander. Sie zeigten mit einer durchschnittlichen Anzahl von 12 Zellen pro untersuchten Areal und einem maximalen Migrationsabstand zum Tumor von durchschnittlich 300 μ m \pm 45 (Kontrolle) und 320 μ m \pm 35 (Phx/DPO) eine vergleichbare Migration wie die Gruppen der vorherigen Versuchsabschnitte

6.4.4 Infiltration

Die HE-gefärbten Histologie-Präparate wurden bezüglich der Infiltration der dem Tumor angrenzenden Muskularis beurteilt. Die Tumorzellen infiltrierten an der Tumorbasis die Muskelschichten in der Behandlungsgruppe zu 31,2 \pm 15,2%. In der Kontrollgruppe wurde die Muskularis zu 22,6 \pm 10,6% an der Tumorbasis infiltriert. Diese Werte zeigten keinen signifikanten Unterschied (Abb. 15C).

6.4.5 Proliferation

In der DPO-Gruppe zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil PCNA-positiver Zellen von 84,9 \pm 2,0% im Vergleich zu 74,2 \pm 3,2% in der Kontrolle (Abb. 15D).

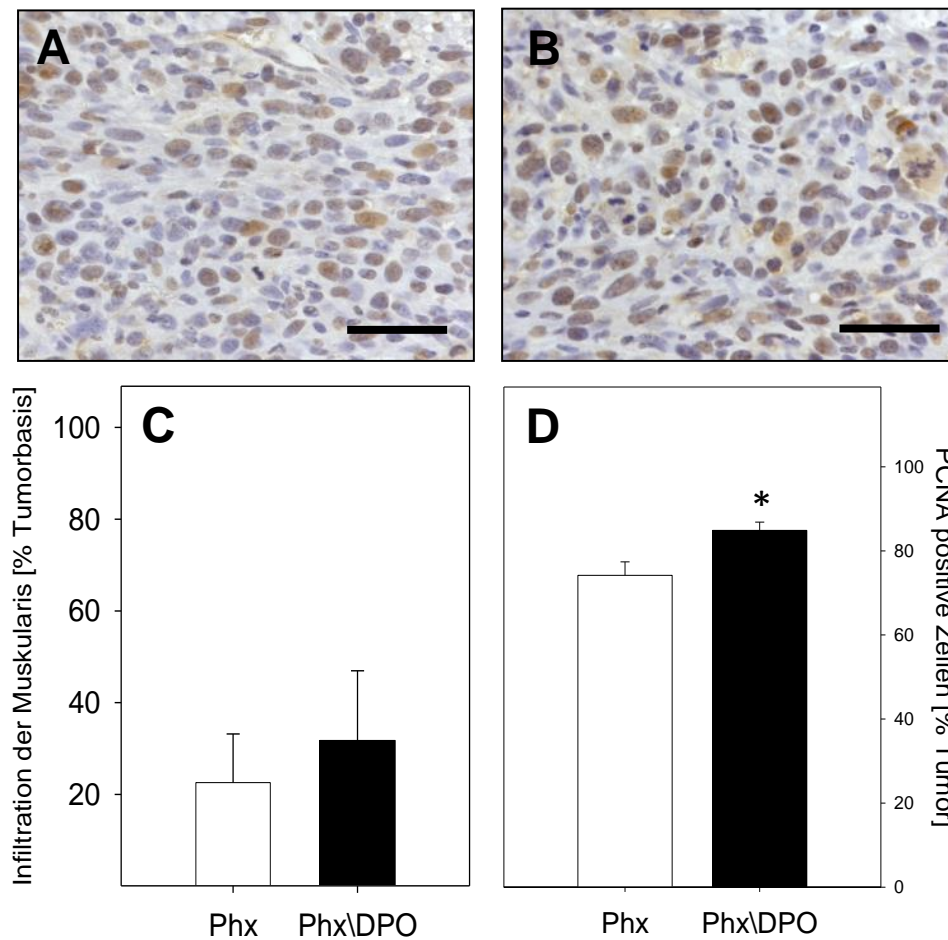


Abbildung 15: Infiltration und Proliferation in extrahepatischen Metastasen nach Phx und DPO-Gabe

A, B: High Power Field mit PCNA gefärbten CT26.WT-Zellen im Lichtmikroskop an Tag 14. Links ein Schnittpräparat eines Tumors eines Kontrolltieres (**A**) und rechts eines DPO-behandelten Tieres (**B**). **C:** Quantitative Darstellung des Anteils der infiltrierten Muskularis-Schicht. **D:** Quantitative Darstellung des prozentualen Anteils PCNA positiver Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Tumorzellen pro 10 HPF. Am Tag 5 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe (weißer Balken) nach Phx 80 μ l PBS und die behandelten Tiere nach Phx 10 μ g/kg KG DPO (schwarzer Balken). MW \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle. Maßstab A;B = 50 μ m

6.4.6 Apoptose

Die Auswertung von jeweils 10 HPFs hinsichtlich der Apoptoserate innerhalb der Tumore mittels Caspase-3-Färbung ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Im Mittel zeigten sich 0,16 bis 0,3 Zellen pro HPF Caspase-3 positiv.

6.4.7 Lebergewicht und Blutanalysen

Die Lebern der Kontrollgruppe wogen im Mittel $1,13 \pm 0,06$ g und die der

Behandlungsgruppe $1,02 \pm 0,05$ g. Die Auswertung der Blutproben ergaben hinsichtlich der Hämoglobinkonzentration einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. In Gruppe 8 war der Hämoglobingehalt mit $12,7 \pm 0,6$ g/dl höher als in der Kontrolle mit $11,4 \pm 0,6$ g /dl. Die Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten waren in beiden Gruppen vergleichbar und im physiologischen Bereich.

6.4.8 Tabellarische Zusammenfassung des Abschnittes IIb

Gruppe	Tumorstadium	Angiogenese	Migration/ Infiltration	Proliferation	Apoptose
7 vs. 8	-	↑	-	↑↑	-

Tabelle 5: Ergebnisse Abschnitt IIb in der Übersicht.

Zusammenfassender Überblick über die Ergebnisse nach PHX und DPO-Gabe an Tag 5 des Experiments. Die „↑↑“ bezeichnen signifikant erhöhte Unterschiede zwischen den Gruppen. Einfache „↑“ zeigen eine beobachtete Tendenz ohne statistische Signifikanz an. Die „-“ bezeichnen keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

7 Diskussion

7.1 Tumormodell kolorektaler Metastasen in der Rücken- hautkammer

Die Ergebnisse der intravitalmikroskopischen Untersuchung dieser Arbeit zeigen in allen Gruppen eine progrediente Zunahme der Tumorfläche in der Rückenhautkammer. Die Beobachtung der, im zeitlichen Verlauf konstanten, Migration und der Nachweis einer aktiven Proliferation belegen das erfolgreiche Anwachsen der Tumorzellen. In allen Gruppen konnte die Ausbildung tumor-assoziiertes Gefäße intravitalmikroskopisch festgestellt werden. Lediglich bei vereinzelt Tieren war intravitalmikroskopisch kein tumor-assoziiertes Gefäß nachweisbar. Die Verteilung dieser Tiere erstreckte sich gleichmäßig verteilt über alle Behandlungsgruppen. In Zusammenschau der Standardfehler innerhalb aller Gruppen kann daher von einem gelungenen Randomisieren der Tiere ausgegangen werden. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten der IVM-Auswertung reihen sich in die vorangegangenen Beobachtungen der Arbeitsgruppe im Rückenhautkammermodell der Maus ein (Rupertus et al., 2007; Rupertus et al., 2009). Die erhobenen Daten zu Tumorwachstum und Tumorangiogenese sind auch mit den Ergebnissen anderer Gruppen mit ähnlichem Beobachtungszeitraum vergleichbar (Guba et al., 2002; Cao et al., 2005). Das Modell kann daher als etabliert betrachtet werden.

7.2 Wirkung von DPO auf das Anwachsen extrahepatischer Metastasen

Die Ergebnisse des ersten Versuchsabschnittes dieser Arbeit zeigen erstmalig den stimulierenden Effekt des EPO-Analogons DPO auf das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen Karzinomzellen *in vivo*. Dies war mit einer beschleunigten Angiogenese und mit einer signifikant gesteigerten Zunahme der Tumorfläche assoziiert. Die Gefäßneubildung war nach zusätzlicher Leberresektion signifikant gesteigert. Das gesteigerte Anwachsen der Tumorzellen nach Implantation und Behandlung an Tag 0 des Experiments kann durch einen direkten Wachstumsstimulus durch DPO mittels EPO-R-Aktivierung begründet sein.

Die Auswertung der Proliferationsraten an Tag 14 des Experiments zeigt jedoch lediglich

eine geringfügige Steigerung der Proliferationsrate. Wie bereits beschrieben vermittelt EPO in den Zielzellen durch Aktivierung des EPO-R eine gesteigerte Proliferation und Apoptoseresistenz (Lacombe et al., 1999; Dasari et al., 2010; Okazaki et al., 2008; Alvarez et al., 2010; Richmond et al., 2005). In mehreren *in vitro* Versuchen von Malignomzellen wurde durch EPO-Behandlung eine gesteigerte Proliferation (Westenfelder et al., 2000; Acs et al., 2001; Yasuda et al., 2003; Feldman et al., 2006; Aguilar et al., 2014) und eine verringerte Apoptoserate (Shiozawa et al., 2013) beobachtet.

In zwei Xenograft-Modellen mit immuninkompetenten Mäusen und humanen Tumorzelllinien war das Tumorwachstum nach repetitiver rhuEPO-Gabe unverändert (Silver et al., 1999; Kataoka et al., 2010). Die Proliferation und Neoangiogenese wurde bei diesen Arbeiten nicht analysiert. Rózsás und Kollegen konnten in einem Xenograft Modell humaner Lungenkarzinomzellen keine Größenzunahme des Flankentumors unter rhuEPO-Gabe feststellen. Allerdings zeigte sich eine gesteigerte Proliferation der tumorassoziierten Endothelzellen (Rózsás et al. 2013). Eine weitere Xenograft Studie zeigte ein verbessertes Ansprechen auf Cisplatin unter rhuEPO-Therapie im Sinne einer reduzierten TumorgroÙe. Gleichzeitig wurde eine erhöhte tumorassoziierte Gefäßdichte in den mit EPO behandelten Tieren festgestellt (Doleschel et al., 2015). Die Kollegen folgerten aus der erhöhten Gefäßdichte eine bessere lokale Bioverfügbarkeit des Chemotherapeutikums und damit verbundene Wirksamkeit im Tumorgewebe. Eine weitere Studie mit humanen Brustkrebszellen zeigte nach EPO-Gabe *in vitro* eine gesteigerte Proliferation und im Xenograft-Modell eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (Doxorubicin, 5-FU). Es wurde des Weiteren sowohl eine vermehrte Metastasenbildung unter alleiniger EPO-Therapie als auch unter der Kombination mit Paclitaxel festgestellt (Todaro et al., 2013). Die Behandlung humaner Brustkrebszellen im Xenograft-Modell von Jin und Kollegen mit repetitiven EPO-Gaben zeigte eine reduzierte Apoptose bei gesteigerter Proliferation, Angiogenese und VEGF-Konzentrationen im Tumorgewebe (Jin et al., 2015).

Hinsichtlich der Effekte unter gleichzeitiger Behandlung mit Chemotherapeutika wurde in einem syngenem *in vivo* Mammacarcinom-Modell gezeigt, dass eine vierwöchige EPO-Behandlung eine Aufhebung der antitumorösen Wirkung von Trastuzumab erzielt (Liang et al., 2010). Dies wurde auf die Aktivierung der JAK2 Kaskade zurückgeführt (siehe 3.3). Zhou und Kollegen zeigten ebenfalls protumoröse Effekte durch EPO-Therapie im syngenem Mausmodell unter JAK/STAT Aktivierung (Zhou et al., 2014). Eine weitere Arbeit zeigte in sieben Tumorzelllinien *in vitro* eine erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin

nach EPO-Behandlung oder GM-CSF- (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) Behandlung, wenn die Zellen die entsprechenden Rezeptoren exprimierten (Liu et al., 2004). Es liegen also in der Literatur heterogene Daten vor, wobei in einigen Xenograft-Studien keine Daten bezüglich der Angiogenese, Proliferation und Apoptoserate erhoben wurden und insgesamt die Anzahl der Studien mit protumorösen Effekten durch ESAs überwiegen.

Eine signifikant gesteigerte Proliferation oder herabgesetzte Apoptoserate ließ sich in unserer Arbeit in der immunhistochemischen Auswertung des Abschnitts I an Tag 14 nicht mehr nachweisen. Interessanterweise sah man in den Gruppen des Versuchsabschnitts II mit verzögerter DPO-Gabe eine signifikant gesteigerte Proliferationsrate nach 70%iger Phx (siehe 6.4.4). Die histologische Untersuchung fand am neunten Tag nach DPO-Gabe statt. In der Arbeit von Rupertus und Kollegen zum intrahepatischen Anwachsen der Tumorzellen nach DPO-Gabe war eine signifikant gesteigerte Proliferationsrate erst nach Kombination mit einer 50%igen Phx beschrieben worden. Die immunhistochemische Auswertung erfolgte an Tag 7 nach Applikation (Rupertus et al., 2010). Bei der Untersuchung der etablierten intrahepatischen Metastasen zeigte sich am siebten Tag sowohl nach alleiniger DPO-Gabe als nach Kombination mit einer Phx, eine signifikant gesteigerte Proliferation (Rupertus et al., 2012). Dies lässt also vermuten, dass die proliferationssteigende Wirkung von DPO zwischen Tag 9 und Tag 14 in extrahepatischen Tumoren bei einer singulären, systemischen Gabe abklingt. Ob bei einer repetitiven Gabe von DPO oder einer früheren Tumorentnahme dieser Effekt in der histologischen Aufarbeitung noch nachweisbar wäre, müssten zusätzliche Studien zeigen. Rupertus und Kollegen zeigten, dass durch eine 24stündige Inkubation mit DPO die Proliferation der CT26.WT-Tumorzellen *in vitro* nicht gesteigert wurde. Die VEGF Expression hingegen war erhöht (Rupertus et al., 2010). Es ist also wahrscheinlich, dass die einmalige DPO-Gabe einen eher indirekten Proliferationsstimulus und antiapoptotischen Effekt auf die Tumorzellen in unserer Studie erzielte. Dieser anfängliche Stimulus scheint in Kombination mit der leicht erhöhten Neovaskularisierung und Angiogenese auszureichen, um mehr Zellen zum Anwachsen und Überleben anzuregen. Dies wiederum resultiert in einer signifikanten Größenzunahme des Tumors im zeitlichen Verlauf.

Zusätzlich muss auch ein indirekter Effekt der DPO-Therapie durch Steigerung der Angiogenese in Betracht gezogen werden. In der aktuellen Arbeit war die Angiogenese in den ersten Tagen des Beobachtungszeitraumes beschleunigt und das Gefäßwachstum nach einmaliger DPO-Gabe über den gesamten Verlauf leicht gesteigert.

Wie unter 3.6 aufgeführt, ist der Anschluss an das Gefäßbett des Wirtsgewebes

unabdingbar zur Ausbildung vitaler Tumormetastasen. Nach Implantation der Tumorzellen kommt es in den ersten Tagen zum Anwachsen der Tumorzellen. Da eine Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch Diffusion nur bis zu einer gewissen Tumorgröße möglich ist, können Tumore ohne Gefäßanschluss nur bis auf wenige Millimeter heranwachsen. (Carmeliet et Jain, 2000; Kerbel et al., 2000). Das Einsproßen neuer Gefäße wird durch endotheliale Vorläuferzellen begünstigt (Moschetta et al., 2014). Endotheliale Progenitorzellen werden im Knochenmark aus Hämangioblasten gebildet (Lin et al., 2000). Sie besitzen die Fähigkeit zur Proliferation, Migration und Ausdifferenzierung zu Endothelzellen.

Okazaki induzierte Fibrosarkome durch subkutane Applikation des Karzinogens MCA in einem syngenem Modell. Nach mehrmaliger EPO-Gabe zeigte sich hier ein gesteigertes Tumorwachstum. Da diese Tumore jedoch keine EPO-R exprimierten, führten die Autoren das gesteigerte Wachstum auf eine gesteigerte Angiogenese zurück. Dies begründeten sie mit der signifikant erhöhten Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen nach EPO-Therapie. Ebenfalls konnte eine gesteigerte Kapillardichte in den Tumoren gezeigt werden (Okazaki et al., 2008).

Die Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark durch EPO-Gabe konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden. Heeschen und Kollegen behandelten Mäuse in drei aufeinanderfolgenden Tagen mit rhuEPO. Die FACS Analyse zeigte nach zwei Wochen eine erhöhte Anzahl EPCs in peripheren Blutproben. Ebenfalls konnte eine gesteigerte Angiogenese in subkutan implantierten Scaffolds der Tiere gezeigt werden (Heeschen et al., 2003). Urao zeigte in einem ähnlichem Experiment nach dreitägiger EPO-Behandlung, neben einer vermehrten EPC-Zahl, gesteigerte Proliferationsraten der Endothelien (Urao et al., 2006). Eine weitere Arbeit behandelte Ratten über fünf Wochen mit repetitiven EPO-Gaben im hämatopoetischen (500UI/kg) und subtherapeutischen Wirkungsbereich (150UI/kg). Man sah eine vermehrte EPC-Anzahl nach der Gabe von 500IU/kg. Zusätzlich wurden Endothelzellen *in vitro* nach EPO Stimulus untersucht. Es zeigte sich eine gesteigerte Mortalität und Proliferation welche auf die Aktivierung der JAK2/STAT5 Signalkaskade zurückgeführt wurde (Ribatti et al., 1999; Janmaat et al., 2010). Asano und Kollegen zeigten eine höhere Ausreifung von tumorassoziierten Gefäßen in humanen Leiomyomen, die vermehrt EPO produzierten im Vergleich zu Tumoren mit geringer EPO Expression (Asano et al., 2015).

Die Angiogenese und Gefäßdichte war nach DPO-Gabe in Abschnitt Ia erhöht, allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung statistisch nicht signifikant (siehe 6.1.2). Dies mag auf die einmalige Gabe von DPO zurückzuführen sein, da die oben aufgeführten

Studien jeweils einen proangiogenen Effekt in ihren Tumormodellen, nach repetitiven EPO-Gaben feststellten. Die Ergebnisse unserer eigenen Arbeitsgruppe, zur Angiogenese und Proliferation bei intrahepatischer Tumormanifestationen, zeigten eine Steigerung dieser nach portalvenöser Gabe (Rupertus et al., 2010; Rupertus et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Gabe systemisch. Dies führt wahrscheinlich aufgrund der Verdünnung zu einem reduzierten lokalen Wirkspiegel im Tumormilieu und lässt einen dosisabhängigen Effekt von DPO vermuten.

In der vorliegenden Studie wurde nach Phx und DPO-Gabe eine signifikant gesteigerte Angiogenese und Gefäßwachstum im Vergleich zur alleinigen Phx gezeigt. Signalmoleküle, wie sie durch Läsionen, Ischämien und auch Tumorgewebe abgegeben werden, bewirken eine Mobilisierung der EPCs (Kahkoo et Finkler, 2005; Kopp et al., 2006). Durch Botenstoffe wie vascular endothelial growth factor (VEGF) oder Chemokine wie stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 α) werden die zirkulierenden EPC im Tumorgewebe rekrutiert. Es kommt zum Aussprossen neuer Gefäßäste, sowie durch eine parakrine Wirkung zur Proliferation bestehender Donorgefäße (Janic et al., 2010). Diese Faktoren werden ebenfalls während der Leberegeneration exprimiert (Fausto et al., 2006). Eine gesteigerte Angiogenese und damit verbundenes Tumorwachstum durch lokale SDF-1 α Wirkung im extrahepatischen Tumormilieu konnte durch Kollmar und Kollegen gezeigt werden (Kollmar et al., 2007). Eine erhöhte VEGF-Expression und Proliferationssteigerung der tumorassoziierten Endothelzellen unter EPO-Gabe wurde ebenfalls beschrieben (Xue et al., 2012; Rózsás et al. 2013; Jin et al., 2015). Die ohnehin gesteigerte Neoangiogenese nach Phx konnte, in unserer Arbeit dementsprechend durch DPO-Gabe noch gesteigert werden. Dies lässt auf einen additiven Effekt durch DPO in Kombination mit einer ausgedehnten Phx schließen.

Im Vergleich zu den nicht leberresezierten Gruppen aus Abschnitt Ia zeigten beide Gruppen des Abschnitts Ib ein deutlich beschleunigtes Größenwachstum an Tag 5 und Tag 8. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Rupertus und Mitarbeiter, die ein gesteigertes extrahepatisches Anwachsen der Tumorzellen nach einer 70%igen Phx beobachteten (Rupertus et al., 2007).

Nichtsdestotrotz resultierte das gesteigerte Gefäßwachstum nach Phx und DPO-Gabe nicht in einem statistisch signifikanten Größenwachstum im Vergleich nach alleiniger Phx. In der Subanalyse der Gruppe mit DPO Behandlung lässt sich eine auffällige Heterogenität feststellen. Bei der Hälfte der Tiere findet sich ein deutlich gesteigertes Wachstum, während die andere Hälfte eine Größenzunahme vergleichbar mit der Kontrollgruppe zeigt. Diese Heterogenität könnte auf die Wechselwirkungen der

Leberresektion und der DPO-Gabe zurückzuführen sein. Die induzierte Leberregeneration beinhaltet proinflammatorische Signalkaskaden. Es konnten unter anderem gesteigerte Chemokin-Konzentrationen gezeigt werden (Kollmar et al., 2010). Diese Effekte wurden, wie bereits erläutert, auch als wachstumssteigernde und proangiogene Stimuli auf Tumore beschrieben. Dahingegen können ESAs auch anti-inflammatorische Signalkaskaden begünstigen. Insbesondere wurden bei Ischämie-Reperusionsmodellen der Leber die positiven anti-inflammatorischen Eigenschaften sowohl rhuEPOs als auch DPOs gezeigt (Sepodes et al., 2006; Le Minh et al., 2007; Kumral et al., 2007; Schmeding et al., 2009). Diese beiden unterschiedlichen, sich gegebenenfalls antagonisierenden Wirkmechanismen der Leberregeneration und der DPO-Gabe könnten das unterschiedliche extrahepatische Tumorstadium in einzelnen Tieren erklären.

7.3 Wirkung von DPO auf etablierte extrahepatische Metastasen

In der hier vorgestellten Arbeit wurde erstmals die Auswirkung einer DPO Behandlung nach einer Leberresektion auf etablierte extrahepatische Metastasen kolorektaler Karzinomzellen untersucht. Im Versuchsabschnitt IIa konnte kein gesteigertes Tumorstadium in etablierten Metastasen unter DPO-Gabe festgestellt werden. Dies steht klar im Gegensatz zu den Ergebnissen des ersten Versuchsabschnittes, in welchem eine singuläre DPO-Gabe das Anwachsen der Tumorzellen extrahepatisch begünstigte. Die bereits etablierten Metastasen des Abschnittes II zeigen sich jedoch weder durch eine 70%igen Leberresektion noch in der Kombination mit einer DPO-Behandlung in ihrem Gesamtwachstum beeinflusst. Lediglich hinsichtlich der Proliferationsraten konnte die Kombination aus DPO und Phx eine Steigerung gegenüber der Kontrolle erzielen. Bereits in der Vorarbeit zu etablierten intrahepatischen Metastasen zeigte sich kein signifikant gesteigertes Tumorstadium nach DPO-Gabe und Leberresektion (Rupertus et al., 2012). Es war jedoch ebenfalls, wie bei neu implantierten Tumorzellen, die Angiogenese und Proliferation gesteigert. Yokoyama et al. beschrieb ein verringertes Tumorstadium nach einer 60%igen Leberresektion (Yokoyama et al., 2000). Rashidi und Kollegen beobachteten intrahepatisch dahingegen ein gesteigertes Wachstum nach 30%iger Leberresektion (Rashidi et al., 1999). Zusammenfassend zeigen sich im Modell von Rupertus et al. sowie in der Mehrzahl der experimentellen Arbeiten ein stimulierten Effekt auf die intrahepatischen Metastasen nach Phx (van Dale et Galand, 1988; Mizutani et al., 1992; Panis et al., 1992; De Jong et al., 1995; Slooter et al., 1995; Picardo et al., 1998;

Rashidi et al., 1999).

In Bezug auf die Gefäßneubildung war ein signifikanter Anstieg der Angiogenese und der Gefäßdichte nur im Abschnitt Ib bei einer Kombination aus Phx und DPO-Gabe beobachtet worden. Die etablierten Metastasen hingegen zeigten weder durch Phx noch durch eine DPO-Gabe eine signifikant gesteigerte Gefäßneubildung. Es muss vermutet werden, dass der proangiogene Effekte der Leberregeneration sowie der proangiogene Effekt von DPO zwar im intrahepatischen Tumormilieu sowie in der frühen Anwachsphase auch extrahepatisch wirksam ist. Nach Ablauf des „angiogenic switch“ also Etablierung eines Gefäßnetzwerkes, erscheint eine einmalige DPO-Gabe in etablierten Tumoren keinen starken Einfluss auf das Gefäßbett auszuüben.

Allerdings kann vermutet werden, dass durch dieses Gefäßnetzwerk DPO besser zu den Tumorzellen gelangen kann und dort seine proliferative Wirkung freisetzt. Diese gesteigerte Proliferation muss jedoch nicht zwangsläufig während des 9 Tage dauernden Beobachtungszeitraumes im Abschnitt II in einem gesteigerten Tumorwachstum resultieren. Dies wiederum hätte ein Versuchsmodell mit einem längeren Beobachtungszeitraum erfordert. Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit fokussierte sich jedoch auf die perioperative DPO-Therapie nach Phx. Für diesen Beobachtungszeitraum erscheint das Rückenhautkammermodell als geeignetes Modell, insbesondere in Hinsicht auf die Beobachtung der Angiogenese und das Anwachsen der Tumorzellen. Die proliferative Wirkung nach ESAs Applikation in mehrwöchigen Studienmodellen wurde bereits unter 7.2 beschrieben.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt einer einmaligen systemischen DPO-Gabe auf extrahepatische Metastasen weniger ausgeprägt ist, als auf das intrahepatische Tumormilieu bzw. auf das Anwachsen von Tumorzellen an extrahepatischer Lokalisation.

7.4 Systemische Wirkung von DPO

In Zusammenschau der erhobenen Blutwerte in der vorliegenden Studie sah man keine signifikant erhöhten Hämoglobinwerte. Dies mag in der einmaligen Gabe begründet sein. Ein Anstieg des Hämoglobingehaltes wurde klinisch sowohl für rhuEPO als auch DPO erst nach vier bzw. fünf Wochen bei regelmäßiger Applikation beobachtet (Rizzo et al., 2002; Glaspy et al., 2003). Signifikante Hb-Steigerungen konnten auch im Mausmodell erst nach Langzeitbehandlung mit ESAs nachgewiesen werden (Silver et al., 1999). Die

signifikant erhöhten Thrombozytenwerte in der Behandlungsgruppe lassen dennoch auch in unserem Modell auf eine erfolgreiche systemische Wirkung des Agens schließen. Eine synergistische Wirkung von EPO und Thrombopoietin auf die Hämatopoese wurde beschrieben (Broudy et al., 1995). Eine thrombogene Wirkung nach einmaliger Gabe rhuEPOs wurde bereits in anderen Kleinterversuchen demonstriert (McDonald et al., 1987; Berridge et al., 1988; Shikama et al., 1992).

Das Lebergewicht war 14 Tagen (Abschnitt Ia) beziehungsweise neun Tage nach Phx (Abschnitt IIb) wieder auf ein vergleichbares Niveau mit den Kontrollgruppen angestiegen. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Rupertus am siebten postoperativen Tag zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nochmals eine Gewichtszunahme (Rupertus et al., 2010; Rupertus et al., 2012). Die Leberregeneration scheint daher in diesem Modell nach neun Tagen vollständig abgelaufen zu sein.

7.5 Zusammenfassung und klinischer Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine einmalige DPO-Gabe ein beschleunigtes Anwachsen nicht etablierter Tumorzellen an extrahepatischer Lokalisation bewirkt. Auch eine ausgedehnte Leberresektion in Kombination mit DPO stimulierte in der frühen Wachstumsphase die Tumorzellen und die Gefäßneubildung. Insgesamt ist ein dosisabhängiger und additiver Effekt zu vermuten. Bereits etablierte extrahepatische Metastasen wurden jedoch von einer einmaligen DPO-Gabe im Beobachtungszeitraum weniger beeinflusst. Gerade Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium mit sowohl intrahepatischen als auch extrahepatischen Metastasen, welchen gegebenenfalls bei einer ausgedehnten Leberresektion ein postoperatives Leberversagen droht, könnten daher von einer einmaligen perioperativen DPO-Gabe profitieren. In Zusammenschau der vorangegangenen Arbeiten zur intrahepatischen Wirkung von DPO nach Phx und der hier vorgestellten Arbeit auf die extrahepatische Wirkung zeichnet sich ein positiver Stimulus auf das Anwachsen von Tumorzellen sowohl intrahepatisch und extrahepatisch ab. Da okkulte Tumoraussaaten während einer Operation und mögliche Mikrometastasen nicht auszuschließen sind, könnte durch die perioperative Behandlung mit DPO ein Tumorprogress sowohl intrahepatisch als auch extrahepatisch induziert werden. Eine klinische perioperative Anwendung ist daher als kritisch zu betrachten.

Zusammenfassend zeigen sich die vielfältigen Aspekte der ESAs auf den Organismus. Einerseits können durch die Korrektur der tumorassoziierten Anämie sowohl die

Lebensqualität als auch die Oxygenierung des Gewebes verbessert werden. Dies wiederum kann sich positiv auf die adjuvanten onkologischen Therapieansätze auswirken. Auf der Gegenseite zeigen mehrere Arbeiten eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika unter ESAs Gabe. Die Aktivierung von EPO-Rezeptoren auf den Tumoren selbst kann zu einer vermehrten Proliferation als auch Apoptoseresistenz führen. Als weiteren Effekt kann die Aktivierung der vaskulär assoziierten EPO-Rezeptoren die Tumorangio-genese und das Risiko für Thrombembolische Ereignissen erhöhen (Glaspy, 2014). Es wird daher die Entwicklung und die Erforschung von Antikörpern gegen gewebsspezifische Isoformen des EPO-Rezeptors angestrebt, um nachteiligen Effekte zu vermeiden und gleichzeitig die positiven Eigenschaften von ESAs zu erhalten (Maxwell et al. 2015). Diese Antikörper könnten dann in neue multimodale Therapiekonzepte nach der Leberresektion einfließen, um einerseits die Regenerationskapazität zu unterstützen und andererseits mögliche Tumorresiduen effektiv zu inhibieren.

8 Literaturverzeichnis

1. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004; 239:818-827.
2. Abdalla EK. Resection of colorectal liver metastases. *J Gastrointest Surg*. 2011; 15:416-419.
3. Abdalla EK, Bauer TW, Chun YS, D'Angelica M, Kooby DA, Jarnagin WR. Locoregional surgical and interventional therapies for advanced colorectal cancer liver metastases: expert consensus statements. *HPB* 2013; 15:119-130.
4. Acs G, Acs P, Beckwith SM, Pitts RL, Clements E, Wong K, Verma A. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3561-3565.
5. Aguilar C, Aguilar C, Lopez-Marure R, Jiménez-Sánchez A, Rocha-Zavaleta L. Co-stimulation with stem cell factor and erythropoietin enhances migration of c-Kit expressing cervical cancer cells through the sustained activation of ERK1/2. *Mol Med Rep* 2014; 9:1895-1902.
6. Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN. Emerging targeted therapies for breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:3366-3379.
7. Amgen. Aranesp(Darbepoetin alfa) Package Insert. Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, 2011.
8. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3974-3978.
9. Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol* 2008; 141:14-31.
10. Asano R, Asai-Sato M, Miyagi Y, Mizushima T, Koyama-Sato M, Nagashima Y, Taguri M, Sakakibara H, Hirahara F, Miyagi E. Aberrant expression of erythropoietin in uterine leiomyoma: implications in tumor growth. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213:199.e1-8.
11. Baltaziak M, Wincewicz A, Kanczuga-Koda L, Lotowska JM, Koda M, Sulkowska U, Baltaziak M, Podbielski M, Sobaniec-Lotowska ME, Sulkowski S. The relationships between hypoxia-dependent markers: HIF-1alpha, EPO and EPOR in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2013; 51:320-325.
12. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Rev Cancer* 2003; 3:401-410.
13. Berridge MV, Fraser JK, Carter JM, Lin FK: Effects of recombinant human erythropoietin on megakaryocytes and on platelet production in the rat. *Blood* 1988; 72:970-977.
14. Bert P, Jourdanet L. La Pression Barometrique. *Researches de Physiologie Experimentale*. Paris: Masson; 1878.

15. Bockhorn M, Fingas CD, Rauen U, Canbay A, Sotiropoulos GC, Frey U, Sheu SY, Wohlschläger J, Broelsch CE, Schlaak JF. Erythropoietin treatment improves liver regeneration and survival in rat models of extended liver resection and living donor liver transplantation. *Transplantation* 2008; 86:1578-1585.
16. Bohlius J, Schmidlin K, Brillant C, Schwarzer G, Trelle S, Seidenfeld J, Zwahlen M, Clarke M, Weingart O, Kluge S, Piper M, Rades D, Steensma DP, Djulbegovic B, Fey MF, Ray-Coquard I, Machtay M, Moebus V, Thomas G, Untch M, Schumacher M, Egger M, Engert A. Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2009; 373:1532-1542.
17. Bonsdorff E, Jalavisto E. A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand* 1948; 16:150-170.
18. Boudot C, Petitfrere E, Kadri Z, Chretien S, Mayeux P, Haye B, Billat C. Erythropoietin induces glycosylphosphatidylinositol hydrolysis. Possible involvement of phospholipase c-gamma(2). *J Biol Chem* 1999; 274:33966-33972.
19. Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 1991; 77:2583-2590.
20. Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K. Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* 1995; 85:1719-1726.
21. Cao Y, Li CY, Moeller BJ, Yu D, Zhao Y, Dreher MR, Shan S, Dewhirst MW. Observation of incipient tumor angiogenesis that is independent of hypoxia and hypoxia inducible factor-1 activation. *Cancer Res* 2005; 65:5498-5505.
22. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-257.
23. Carnot P, Deflandre C. Sur l'activité hémopoïétique du serum au cours de la régénération du sang. *CR Acad Sci Paris* 1906; 143:384-386.
24. Castillo MH, Doerr RJ, Paolini N Jr, Cohen S, Goldrosen M. Hepatectomy prolongs survival of mice with induced liver metastases. *Arch Surg* 1989; 124:167-169.
25. Cella D, Kallich J, McDermott A, Xu X. The longitudinal relationship of hemoglobin, fatigue and quality of life in anemic cancer patients: results from five randomized clinical trials. *Ann Oncol* 2004; 15:979-986
26. Chabowska AM, Sulkowska M, Chabowski A, Wincewicz A, Koda M, Sulkowski S. Erythropoietin and erythropoietin receptor in colorectal cancer. *Int J Surg Pathol* 2008; 16:269-276.
27. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:563-572.
28. Chang YC. Low mortality major hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2004; 51:1766-1770.

29. Chen C, Sytkowski AJ. Erythropoietin activates two distinct signalling pathways required for the initiation and the elongation of c-myc. *J Biol Chem* 2001; 276:38518-38526.
30. Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, Sumetchotimetha W, Rangsin R, Schulick RD, Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* 2002; 235:759-766.
31. Chu E. An update on the current and emerging targeted agents in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2012; 11:1-13.
32. Chua TC, Saxena A, Liauw W, Kokandi A, Morris DL. Systematic review of randomized and nonrandomized trials of the clinical response and outcomes of neoadjuvant systemic chemotherapy for resectable colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2010; 2:492-501.
33. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 2002; 109:987-991.
34. Dalakas E, Newsome PN, Harrison DJ, Plevris JN. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J* 2005; 19:1225-1231.
35. Dasari A, Messersmith WA. New strategies in colorectal cancer: biomarkers of response to epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies and potential therapeutic targets in phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *Clin Cancer Res* 2010; 16:3811-3818.
36. De Jong KP, Lont HE, Bijma AM, Brouwers MA, de Vries EG, van Veen ML, Marquet RL, Slooff MJ, Terpstra OT. The effect of partial hepatectomy on tumor growth in rats: in vivo and in vitro studies. *Hepatology* 1995; 22:1263-1272.
37. Doerr R, Castillo M, Evans P, Paolini N, Goldrosen M, Cohen SA. Partial hepatectomy augments the liver's antitumor response. *Arch Surg* 1989; 124:170-174.
38. Doleschel D, Rix A, Arns S, Palmowski K, Gremse F, Merkle R, Salopiata F, Klingmüller U, Jarsch M, Kiessling F, Lederle W. Erythropoietin improves the accumulation and therapeutic effects of carboplatin by enhancing tumor vascularization and perfusion. *Theranostics* 2015; 5:905-918.
39. Drixler TA, Borel Rinkes IH, Ritchie ED, van Vroonhoven TJ, Gebbink MF, Voest EE. Continuous administration of angiostatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastases after partial hepatectomy. *Cancer Res* 2000; 60:1761-1765.
40. Fandrey J. Oxygen-dependent and tissuespecific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286:977-988.
41. Farges O, Malassagne B, Flejou JF, Balzan S, Sauvanet A, Belghiti J. Risk of major liver resection in patients with underlying chronic liver disease: a reappraisal. *Ann Surg* 1999; 229:210-215.
42. Farrell F, Lee A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist* 2004; 9:18-30.
43. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43:45-53.

44. Feldman L, Wang Y, Rhim JS, Bhattacharya N, Loda M, Sytkowski AJ. Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells. *Prostate* 2006; 66:135-145.
45. Fong Y, Fortner J, Sin RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 1999; 230:309-318.
46. Fong Y. Surgical therapy of hepatic colorectal metastasis. *CA Cancer J Clin* 1999; 49:231-255.
47. Galli L, Ricci C, Egan CG. Epoetin beta for the treatment of chemotherapy-induced anemia: an update. *Onco Targets Ther* 2015; 8:583-591.
48. Garcea G, Maddern GJ. Liver failure after major hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16:145-155.
49. Gehling UM, Willems M, Dandri M, Petersen J, Berna M, Thill M, Wulf T, Müller L, Pollok JM, Schlagner K, Faltz C, Hossfeld DK, Rogiers X. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J Hepatol* 2005; 43:845-853.
50. Glaspy JA, Jadeja JS, Justice G, Fleishman A, Rossi G, Colowick AB: A randomized, active-control, pilot trial of front-loaded dosing regimens of darbepoetin-alfa for the treatment of patients with anaemia during chemotherapy for malignant disease. *Cancer* 2003; 97:1312-1320.
51. Glaspy J. Current status of use of erythropoietic agents in cancer patients. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40:306-312.
52. Goldwasser E, Kung CKH. Progress in the purification of erythropoietin. *Ann NY Acad Sci* 1968; 149:49-53.
53. Gimbrone MA, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1972;136:261-276.
54. Groopman JE, Itri LM. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91:1616-1634.
55. 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. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002; 8:128-135.
56. Hedenus M, Adriansson M, San Miguel J, Kramer MH, Schipperus MR, Juvonen E, Taylor K, Belch A, Altés A, Martinelli G, Watson D, Matcham J, Rossi G, Littlewood TJ; Darbepoetin Alfa 20000161 Study Group. Efficacy and safety of darbepoetin alfa in anaemic patients with lymphoproliferative malignancies: a randomized, double-blind, placebo- controlled study. *Br J Haematol* 2003; 122:394-403.

57. Henke M, Laszig R, Rube C, Schäfer U, Haase KD, Schilcher B, Mose S, Beer KT, Burger U, Dougherty C, Frommhold H. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 362:1255-1260.
58. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102:1340-1346.
59. Hjorte E. Reticulocyte increase after injection of anemic serum. *Norsk Mag F Laegevidensk* 1936; 97:270-277.
60. Imamura H, Seyama Y, Kokudo N, Maema A, Sugawara Y, Sano K, Takayama T, Makuuchi M. One thousand fifty-six hepatectomies without mortality in 8 years. *Arch Surg* 2003; 138:1198-1206.
61. Janmaat ML, Heerkens JL, de Bruin AM, Klous A, de Waard V, de Vries CJ. Erythropoietin accelerates smooth muscle cell-rich vascular lesion formation in mice through endothelial cell activation involving enhanced PDGF-BB release. *Blood* 2010; 115:1453-1460.
62. Jain RK, Munn LL, Fukumuma D. Dissecting tumor pathophysiology using intravital microscopy. *Nature Rev Cancer* 2002; 2:266-276.
63. Janic B, Arbab AS. The role and therapeutic potential of endothelial progenitor cells in tumor neovascularization. *Scientific World Journal* 2010; 10:1088-1099.
64. Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, DeMatteo RP, Ben-Porat L, Little S, Corvera C, Weber S, Blumgart LH. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1803 consecutive cases over the past decade. *Ann Surg* 2002; 236:397-406.
65. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med* 2004; 43: 649-659.
66. Jemal A, DVM, Siegel R, Xu J, Ward E, *Cancer Statistics, 2010*. *CA Cancer J Clin* 2010; 60:277-300.
67. Jin W, Lin Z, Zhang X, Kong L, Yang L. Effects and mechanism of recombinant human erythropoietin on the growth of human breast cancer MDA-MB-231 cells in nude mice. *Pathol Res Pract* 2015; 211:570-576.
68. Kataoka M, Moriya Y, Moriguchi Y, Iwai T, Fujimoto-Ouchi K, Shirane M, Kondoh K, Mori K. Effect of erythropoietin on human tumor growth in xenograft models. *Mol Med Rep* 2010; 3:95-101.
69. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21:505-515.
70. Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med* 2005; 56:79-101.
71. Klein HG, Spahn DR, Carson JL. Red blood cell transfusion in clinical practice. *Lancet* 2007; 370:415-426.

72. Klemm K, Eipel C, Cantré D, Abshagen K, Menger MD, Vollmar B. Multiple doses of erythropoietin impair liver regeneration by increasing TNF-alpha, the Bax to Bcl-xL ratio and apoptotic cell death. *PLoS One* 2008; 3:e3924.
73. Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1 and MMP-9 are involved in stress induced Human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112:160-169.
74. Kollmar O, Schilling MK, Menger MD. Experimental liver metastasis: standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21:453-460.
75. Kollmar O, Menger MD, Schilling MK. Macrophage inflammatory protein-2 contributes to liver resection-induced acceleration of hepatic metastatic tumor growth. *World J Gastroenterol* 2006; 12:858-867.
76. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Nickels RM, Haberl GC, Tilton B, Menger MD, Schilling MK. CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *Int J Cancer* 2010; 126:1302-1315.
77. Komatsu N, Adamson JW, Yamamoto K, Altschuler D, Torti M, Marzocchini R, Lapetina EG. Erythropoietin rapidly induces tyrosine phosphorylation in the human erythropoietin-dependent cell line UT-7. *Blood* 1992; 80:53-59.
78. Kopp HG, Ramos CA, Rafii S., Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue, *Curr Opin Hematol* 2006; 13:175-181.
79. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, Grothey A, Vauthey JN, Nagorney DM, McWilliams RR. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009; 27:3677-3683.
80. Koury MJ, ST, Bondurant MC, Semenza GL. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood* 1991; 77:2497-2503.
81. Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2013.
82. Kumral A, Baskin H, Yesilirmak DC, Ergur BU, Aykan S, Genc S, Genc K, Yilmaz O, Tugyan K, Giray O, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Neonatology* 2007; 92:269-278.
83. Kuratowska Z, Lewartowski B, Michalak E. Studies on the production of erythropoietin by isolated perfused organs. *Blood* 1961; 18:527-534.
84. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:22-28.
85. Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. *Oncologist* 2003; 8:15-18.

86. Le Minh K, Klemm K, Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice. *Am J Pathol* 2007; 170:1954-1963.
87. Lee-Huang Sylvia. Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1984; 81:2708-2712.
88. Leyland-Jones B, Semiglazov V, Pawlicki M, Pienkowski T, Tjulandin S, Manikhas G, Makhson A, Roth A, Dodwell D, Baselga J, Biakhov M, Valuckas K, Voznyi E, Liu X, Vercammen E. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J Clin Oncol* 2005; 23:5960-5972.
89. Liang K, Esteva FJ, Albarracin C, Stemke-Hale K, Lu Y, Bianchini G, Yang CY, Li Y, Li X, Chen CT, Mills GB, Hortobagyi GN, Mendelsohn J, Hung MC, Fan Z. Recombinant Human Erythropoietin Antagonizes Trastuzumab Treatment of Breast Cancer Cells via Jak2-Mediated Activation of Src and Inactivation of PTEN. *Cancer Cell* 2010; 18:423-435.
90. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, Badrawi SM, Lai P, Goldwasser E. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:7580-7584.
91. Lin TS, Mahajan S, Frank DA. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene* 2000; 19:2496-2504.
92. Lin Y, D.J.Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP, Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000; 105:71-77.
93. Littlewood TJ, Bajetta E, Nortier JW, Vercammen E, Rapoport B. Effects of epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 2001; 19:2865-2874.
94. Liu WM, Powles T, Shamash J, Propper D, Oliver T, Joel S. Effect of haemopoietic growth factors on cancer cell lines and their role in chemosensitivity. *Oncogene* 2004; 23:981-990
95. Liu W, Song QK, Xing BC. A systematic review and meta-analysis to reappraise the role of adjuvant hepatic arterial infusion for colorectal cancer liver metastases. *Int J Colorectal Dis* 2015; 30:1091-1102.
96. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Yonekawa Y, Bauer C, Gassmann M. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 1996; 8:666-676.
97. Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas F Jr, Tabira T, Sasaki R. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics: comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 1993; 268:11208-11216.

98. Mavier P, Martin N, Couchie D, Préaux A-M, Laperche Y, Zafrani ES. Expression of stromal cell-derived factor-1 and of its receptor CXCR4 in liver regeneration from oval cells in rat. *Am J Pathol* 2004; 165:1969-1977.
99. Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Iredale JP, Pugh CW, Johnson MH, Ratcliffe PJ. Sites of erythropoietin production. *Kidney Int* 1997; 51:393-401.
100. Maxwell P, Melendez-Rodríguez F, Matchett KB, Aragones J, Ben-Califa N, Jaekel H, Hengst L, Lindner H, Bernardini A, Brockmeier U, Fandrey J, Grunert F, Oster HS, Mittelman M, El-Tanani M, Thiersch M, Schneider Gasser EM, Gassmann M, Dangoor D, Cuthbert RJ, Irvine A, Jordan A, Lappin T, Thompson J, Neumann D. Novel antibodies directed against the human erythropoietin receptor: creating a basis for clinical implementation. *Br J Haematol* 2015; 168:429-442.
101. McDonald TP, Cottrell MB, Clift RE, Cullen WC, Lin FK: High doses of recombinant erythropoietin stimulate platelet production in mice. *Exp Hematol* 1987; 15:719-721.
102. McDonnell S, Chaudhry V, Mansilla-Soto J, Zeng ZS, Shu WP, Guillem JG. Metastatic and non-metastatic colorectal cancer (CRC) cells induce host metalloproteinase production in vivo. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17:341-349.
103. Menger MD, Laschke MW, Vollmar B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 2002; 34:83-91.
104. Menger MD, Laschke MW, Amon M, Schramm R, Thorlacius H, Rücker M, Vollmar B. Experimental models to study microcirculatory dysfunction in muscle ischemia- reperfusion and osteomyocutaneous flap transfer. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 388:281-290.
105. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276:60-66.
106. Mizutani J, Hiraoka T, Yamashita R, Miyauchi Y. Promotion of hepatic metastases by liver resection in the rat. *Br J Cancer* 1992; 65:794-797.
107. Moschetta M, Mishima Y, Sahin I, Manier S, Glavey S, Vacca A, Roccaro AM, Ghobrial IM. Role of endothelial progenitor cells in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1846:26-39.
108. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature Rev Cancer* 2004; 4:839-849.
109. Okazaki T, Ebihara S, Asada M, Yamanda S, Niu K, Arai H. Erythropoietin promotes the growth of tumors lacking its receptor and decreases survival of tumor-bearing mice by enhancing angiogenesis. *Neoplasia* 2008; 10:932-939.
110. Okamoto R, Ueno M, Yamada Y, Takahashi N, Sano H, Suda T, Takakura N. Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. *Blood* 2005; 105:2757-2763.
111. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast

- carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF- 1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121:335-348.
112. Overbay DK, Manley HJ. Darbepoetin-alpha: a review of the literature. *Pharmacotherapy* 2002; 22:889-897.
113. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metast Rev* 1998; 8:98-101.
114. Panis Y, Ribeiro J, Chretien Y, Nordlinger B. Dormant liver metastases: an experimental study. *Br J Surg* 1992; 79:221-223.
115. Park SL, Won SY, Song JH, Kim WJ, Moon SK. EPO gene expression induces the proliferation, migration and invasion of bladder cancer cells through the p21WAF1-mediated ERK1/2/NF- κ B/MMP-9 pathway. *Oncol Rep.* 2014; 32:2207-2214.
116. Picardo A, Karpoff HM, Ng B, Lee J, Brennan MF, Fong Y. Partial hepatectomy accelerates local tumor growth: potential roles of local cytokine activation. *Surgery* 1998; 124:57-64.
117. Rashidi B, An Z, Sun FX, Sasson A, Gamagammi R, Moossa AR, Hoffman RM. Minimal liver resection strongly stimulates the growth of human colon cancer in the liver of nude mice. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17:497-500.
118. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999; 93:2627-2636.
119. Ribatti D. Erythropoietin, the first century. *Leuk Res* 2008; 32:1169-1172.
120. Richmond TD, Chohan M, Barber DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 2005; 15:146-155.
121. Rizzo JD, Lichtin AE, Woolf SH, Seidenfeld J, Bennett CL, Cella D, Djulbegovic B, Goode MJ, Jakubowski AA, Lee SJ, Miller CB, Rarick MU, Regan DH, Browman GP, Gordon MS. Use of epoetin in patients with cancer: evidence-based clinical practice guidelines of the american society of clinical oncology and the american society of hematology. *J Clin Oncol.* 2002; 20:4083-4107.
122. Rizzo JD, Brouwers M, Hurley P, Seidenfeld J, Arcasoy MO, Spivak JL, Bennett CL, Bohlius J, Evanchuk D, Goode MJ, Jakubowski AA, Regan DH, Somerfield MR; American Society of Clinical Oncology; American Society of Hematology. American Society of Clinical Oncology/American Society of Hematology clinical practice guideline update on the use of epoetin and darbepoetin in adult patients with cancer. *J Clin Oncol* 2010 20; 28:4996-5010.
123. Rózsás A, Berta J, Rojkó L, Horváth LZ, Keszthelyi M, Kenessey I, László V, Berger W, Grusch M, Hoda MA, Török S, Klepetko W, Rényi-Vámos F, Hegedűs B, Döme B, Tóvári J. Erythropoietin receptor expression is a potential prognostic factor in human lung adenocarcinoma. *PLoS One* 2013; 8:e77459.

124. Rupertus K, Kollmar O, Scheuer C, Junker B, Menger MD, Schilling MK. Major but not minor hepatectomy accelerates engraftment of extrahepatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 2007; 24:39-48
125. Rupertus K. Einfluss des Stromal Cell-derived Factor (SDF)-1 auf Tumorwachstum und Angiogenese kolorektaler Metastasen. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes. 2008.
126. Rupertus K, Dahlem C, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O: Rapamycin Inhibits Hepatectomy-Induced Stimulation of Metastatic Tumor Growth by Reduction of Angiogenesis, Microvascular Blood Perfusion, and Tumor Cell Proliferation. *Ann Surg Oncol* 2009; 16:2629-2637
127. Rupertus K, Sperling J, Corsten M, Scheuer C, Nickels RM, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O. Darbepoetin-alpha enhances hepatectomy-associated stimulation of colorectal liver metastatic growth. *Ann Surg* 2010; 252:131-141.
128. Rupertus K, Senger S, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O. Darbepoetin- α promotes neovascularization and cell proliferation in established colorectal liver metastases. *J Surg Res* 2012; 176:517-523.
129. Sander G. Über die Blutbildende Wirkung des Serums von Tieren, die in verdünnter Luft gehalten wurden. *Zeitsch Ges Exper Medizin* 1932; 82:633-646.
130. Sasaki R, Masuda S, Nagao M: Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64:1775-1793.
131. Scotté M, Masson S, Lyoumi S, Hiron M, Ténrière P, Lebreton JP, Daveau M. Cytokine gene expression in liver following minor or major hepatectomy in rat. *Cytokine* 1997; 9:859-867.
132. Schindel DT, Grosfeld JL. Hepatic resection enhances growth of residual intrahepatic and subcutaneous hepatoma, which is inhibited by octreotide. *J Pediatr Surg* 1997; 32:995-998.
133. Schadde E, Ardiles V, Slankamenac K, Tschuor C, Sergeant G, Amacker N, Baumgart J, Croome K, Hernandez-Alejandro R, Lang H, de Santibañes E, Clavien PA. ALPPS offers a better chance of complete resection in patients with primarily unresectable liver tumors compared with conventional-staged hepatectomies: results of a multicenter analysis. *World J Surg* 2014; 38:1510-1519.
134. Schmeding M, Boas-Knoop S, Lippert S, Ruehl M, Somasundaram R, Dagdelen T, Neuhaus P, Neumann UP. Erythropoietin promotes hepatic regeneration after extended liver resection in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23:1125-1131.
135. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA, Fichtner-Feigl S, Lorf T, Goralcyk A, Hörbelt R, Kroemer A, Loss M, Rümmele P, Scherer MN, Padberg W, Königsrainer A, Lang H, Obed A, Schlitt HJ. Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Ann Surg* 2012; 255:405-414.

136. Selzer E, Wacheck V, Kodym R, Schlagbauer-Wadl H, Schlegel W, Pehamberger H, Jansen B. Erythropoietin receptor expression in human melanoma cells. *Melanoma Res* 2000; 10:421-426.
137. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* 2004; 19:176-182.
138. Sepodes B, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, McDonald M, Yaqoob M, Thiemermann C, Mota-Filipe H. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int* 2006; 19:919-926.
139. Shikama Y, Ishibashi T, Kimura H, Kawaguchi M, Uchida T, Maruyama Y. Transient effect of erythropoietin on thrombocytopoiesis in vivo in mice. *Exp Hematol* 1992; 20:216-222.
140. Shiozawa Y, McGee S, Pienta MJ, McGregor N, Jung Y, Yumoto K, Wang J, Berry JE, Pienta KJ, Taichman RS. Erythropoietin Supports the Survival of Prostate Cancer, But Not Growth and Bone Metastasis. *J Cell Biochem* 2013; 114:2471-2478.
141. Silva CM. Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 2004; 23:8017-8023.
142. Silver DF, Piver MS. Effects of recombinant human erythropoietin on the antitumor effect of cisplatin in SCID mice bearing human ovarian cancer: a possible oxygen effect. *Gynecol Oncol* 1999; 73:280-284.
143. Slooter GD, Marquet RL, Jeekel J, Ijzermans JNM. Tumor growth stimulation after partial hepatectomy can be reduced by treatment with tumor necrosis factor α . *Br J Surg* 1995; 82:129-132.
144. Steinbauer M, Guba M, Cernaianu G, Köhl G, Cetto M, Kunz-Schughart LA, Geissler EK, Falk W, Jauch K-W. GFP-transfected tumor cells are useful in examining early metastasis in vivo, but immune reaction precludes long-term tumor development studies in immunocompetent mice. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20:135-141.
145. Stewart GD, O'Suilleabhain CB, Madhavan KK, Wigmore SJ, Parks RW, Garden OJ The extent of resection influences outcome following hepatectomy for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30:370-376.
146. Stolz DB, Mars WM, Petersen BE, Kim TH, Michalopoulos GK. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res* 1999; 59:3954-3960.
147. Sturm JW, Keese MA, Petruch B, Bönninghoff RG, Zhang H, Gretz N, Hafner M, Post S, McCuskey RS. Enhanced green fluorescent protein-transfection of murine colon carcinoma cells: key for early tumor detection and quantification. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20:395-405.
148. Tannenbaum CS, Wicker N, Armstrong D, Tubbs R, Finke J, Bukowski RM, Hamilton TA. Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL12. *J Immunol* 1996; 156:693-699.

149. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:836-847.
150. Thews O, Koenig R, Kelleher DK, Kutzner J, Vaupel P. Enhanced radiosensitivity in experimental tumours following erythropoietin treatment of chemotherapy-induced anaemia. *Br J Cancer* 1998; 78:752-756.
151. Todaro M, Turdo A, Bartucci M, Iovino F, Dattilo R, Biffoni M, Stassi G, Federici G, De Maria R, Zeuner A. Erythropoietin activates cell survival pathways in breast cancer stem-like cells to protect them from chemotherapy. *Cancer Res* 2013; 73:6393-6400.
152. Tonelli M, Hemmelgarn B, Reiman T, Manns B, Reaume MN, Lloyd A, Wiebe N, Klarenbach S. Benefits and harms of erythropoiesis-stimulating agents for anemia related to cancer: a meta-analysis. *CMAJ* 2009; 180:62-71.
153. Urao N, Okigaki M, Yamada H, Aadachi Y, Matsuno K, Matsui A, Matsunaga S, Tateishi K, Nomura T, Takahashi T, Tatsumi T, Matsubara H. Erythropoietin mobilized endothelial progenitors, enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. *Circ Res* 2006; 98:1405-1413.
154. van Dale P, Galand P. Effect of partial hepatectomy on experimental liver invasion by intraportally injected colon carcinoma cells in rats. *Invasion Metastasis* 1988; 8:217-227.
155. Vansteenkiste J, Pirker R, Massuti B, Barata F, Font A, Fiegl M, Siena S, Gateley J, Tomita D, Colowick AB, Musil J, Aranesp 980297 Study Group. Double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of darbepoetin alfa in lung cancer patients receiving chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94:1211-1220.
156. Vajkoczy P, Ullrich A, Menger MD. Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* 2000; 2:53-61.
157. Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A, Tonn JC, Menger MD, Breier G. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest* 2002; 109:777-785.
158. von Heesen M, Schuld J, Sperling J, Grünhage F, Lammert F, Richter S, Schilling MK, Kollmar O. Parenchyma-preserving hepatic resection for colorectal liver metastases. *Langenbecks Arch Surg* 2012; 397:383-395
159. Wang M, Bronte V, Chen PW, Gritz L, Panicali D, Rosenberg SA, Restifo NP. Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor associated antigen. *The Journal of Immunology* 1995; 154:4685-4692.
160. Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, Reid C, Downing MR, Coresh PM. Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* 1986; 2:1175-1178.
161. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CH, Lopez MJ, Shaw-Dunn RI, Sugar J, Davies JD, Day DW, Harlos JP

- Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol* 1986; 150:195-203
162. Westenfelder C, Baranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int* 2000; 58:647-657.
163. Xue Y, Lim S, Yang Y, Wang Z, Jensen LD, Hedlund EM, Andersson P, Sasahara M, Larsson O, Galter D, Cao R, Hosaka K, Cao Y. PDGF-BB modulates hematopoiesis and tumor angiogenesis by inducing erythropoietin production in stromal cells. *Nature Medicine* 2012; 18:100-110.
164. Yamamoto J, Shimida K, Kosuge T, Yamasaki S, Sakamoto M, Fukuda H. Factors influencing survival of patients undergoing hepatectomy for colorectal metastases. *Br J Surg* 1999; 86:332-337.
165. Yang Z, Sun B, Zhao X, Shao B, An J, Gu Q, Wang Y, Dong X, Zhang Y, Qiu Z. Erythropoietin and erythropoietin receptor in hepatocellular carcinoma: correlation with vasculogenic mimicry and poor prognosis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:4033-4043.
166. Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, Koinuma S, Hara S, Tazaki A, Onozaki M, Hashimoto M, Musha T, Ogawa K, Fujita H, Nakamura Y, Shiozaki H, Utsumi H. Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 2003; 24:1021-1029.
167. Yokoyama H, Goto S, Chen CL, Pan TL, Kawano K, Kitano S. Major hepatic resection may suppress the growth of tumours remaining in the residual liver. *Br J Cancer* 2000; 83:1096-1101.
168. Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 2003; 63:3833-3839.
169. Zhou B, Damrauer JS, Bailey ST, Hadzic T, Jeong Y, Clark K, Fan C, Murphy L, Lee CY, Troester MA, Miller CR, Jin J, Darr D, Perou CM, Levine RL, Diehn M, Kim WY. Erythropoietin promotes breast tumorigenesis through tumor-initiating cell self-renewal. *J Clin Invest* 2014; 124:553-563.

9 Publikationen

9.1 Publikationen

Senger S, Kollmar O, Menger MD, Rupertus K. Darbepoetin- α Promotes Cell Proliferation in Established Extrahepatic Colorectal Tumors after Major Hepatectomy. *Eur Surg Res* 2016; 56:49-60

Senger S, Keiner D, Hendrix P, Oertel J. New target specific oral anticoagulants and intracranial bleedings management and outcome in a single-center case series. *World Neurosurg* 2016; 88:132-139.

Fischer G, **Senger S**, Sharif S, Oertel J. Superficial temporal artery to middle cerebral artery bypass via a minimized approach: operative nuances and problem solving aspects *World Neurosurg* 2016; 88:97-103.

Senger S, Flohr K, Schofer O, Oertel J, Linsler S. Severe Dural Tear and Brain Injury after Vacuum Extraction Birth. *Int J Neurol Brain Disord* 2015; 2:1-3.

Senger S, Kollmar O, Menger MD, Schilling MK, Rupertus K. Darbepoetin- α Accelerates Neovascularization and Engraftment of Extrahepatic Colorectal Metastases. *Eur Surg Res* 2014; 53:25-36.

Rupertus K, **Senger S**, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O. Darbepoetin- α promotes neovascularization and cell proliferation in established colorectal liver metastases. *J Surg Res* 2012; 176:517-523.

9.2 Publizierte Abstracts

Senger S; Vulcu S; Gaab M; Schroeder H; Oertel J. Results of combined intraventricular neuroendoscopic procedures in 132 cases. 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC); Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2015.; DocDi.05.01 /20150602/ doi:10.3205/15dgnc117.

Hendrix P, **Senger S**, Dweek M, Oertel J, Schwerdtfeger K. First clinical experience with the preoperative navigated transcranial magnetic stimulation in over 50 cases of intracranial lesions. 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC); 20150607-20150610; Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2015. DocDI.17.04 /20150602/ doi:10.3205/15dgnc381

Senger S, Keiner D, Vulcu S, Schwerdtfeger K, Oertel J. Intraoperative imaging of microhemodynamics in peripheral nerves by contact endoscope. 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC). Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2014. DocDI.08.06 doi: 10.3205/14dgnc157 May 13, 2014.

D. Keiner, **S. Seneger**, J. Oertel Neue Antikoagulantien – Erfahrungen und Management nach traumatischen und spontanen intrakraniellen Blutungen in der Neurochirurgischen Klinik der Universitätsklinik des Saarlandes 2011-2013. Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung 2014; Band1:1-167.

S. Seneger, K. Rupterus, M.D. Menger, M.K. Schilling, O. Kollmar. Influence of Darbepoetin- α on neovascularization, tumor cell engraftment and growth of established extrahepatic colorectal metastasis. Langenbeck's Archives of Surgery 2012; 397:627-671.

S. Seneger, S. Dold, B. Huber, J. Sperling, M.D. Menger² M.K. Schilling, O. Kollmar. Rapamycin inhibits extrahepatic tumor growth induced by portal branch ligation. Langenbeck's Archives of Surgery 2011; 396:871-936.

S. Seneger, S.G. Müller, M.W. Laschke, M.D. Menger Leukocyte-endothelial cell interaction in brain vessels is enhanced by circulating silver nanoparticles. J Vasc Res 2011; 48 (suppl 1):4-356.

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation mit der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar (damaliger Direktor: Herr Prof. Dr. med. M. K. Schilling) und dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar (Direktor: Herr Prof. Dr. med. M. D. Menger) durchgeführt.

Meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. O. Kollmar danke ich für die jahrelange Unterstützung und die Einführung in die medizinische Forschung, zuerst als Student und anschließend als Arzt. Durch seine Betreuung und Ratschläge, auch aus der Ferne, konnte ich erste Erfahrungen in der Ausarbeitung eigener wissenschaftlicher Vorträge und Publikationen sammeln.

Herrn Prof. Dr. med. M. D. Menger und Herrn PD Dr. med. M. Laschke danke ich für die jahrelange Unterstützung und vielen Ratschläge. Durch ihre Motivation und Hilfsbereitschaft war es mir möglich eigene Projekte zu etablieren und neben dem klinischen Alltag weiterhin zu forschen.

Frau Dr. rer. med. C. Scheuer danke ich für die stets freundliche und kompetente Beratung im Umgang mit den Tumorzellen und die tatkräftige Unterstützung während der Versuche.

Herrn Prof. Dr. med. J. Oertel danke ich für die Unterstützung und Motivation während der klinischen Tätigkeit weiterhin zu forschen und hierfür entsprechende Freiräume zur Verfügung stellt.

Dem Team des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie danke ich für die Anfertigung der histologischen und immunhistochemischen Präparate. Außerdem möchte ich mich bei Frau C. Marx für die stets zuverlässige Aufbereitung der Tumorzellen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit ein einmaliges Arbeitsklima schaffen, in welchem man auch gerne nach einem langen Kliniktag arbeitet.

