

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor der Klinik (bis Mai 2012): Prof. Dr. Martin K. Schilling

Doktorvater: Prof. Dr. Otto Kollmar

Wirkung von Pfortaderastligatur und Temsirolimus auf extrahepatisches kolorektales Metastasenwachstum im Mausmodell

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2017*

vorgelegt von: Barbara Maria-Theresia Oberkircher, geborene Huber
geboren am 03.12.1982 in Simbach am Inn

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Gutachter: 1

2

3

Datum der Promotion:

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	8
2.	Zusammenfassung.....	10
2.1.	Deutsche Version.....	10
2.2.	Englische Version.....	12
3.	Einleitung.....	13
3.1.	Das kolorektale Karzinom.....	13
3.2.	Kolorektale Metastasen	14
3.3.	Pfortaderastligatur	15
3.4.	Die mTOR-Inhibitoren Rapamycin und Temsirolimus	18
3.5.	Zielsetzung der Arbeit	20
4.	Material und Methoden.....	21
4.1.	Versuchstiere.....	21
4.2.	Anästhesie	22
4.3.	Implantation der Rückenhautkammer	22
4.4.	Laparatomie.....	24
4.5.	Pfortaderastligatur	26

4.6. Tumorzellaufbereitung.....	27
4.7. Tumorzellimplantation	28
4.8. Intravitalmikroskopie	29
4.9. Applikation des Therapeutikums.....	31
4.10. Versuchsabbau	31
4.11. Versuchsprotokoll.....	32
4.12. Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen	37
4.12.1. Tumorgröße/-wachstum	37
4.12.2. Kapillardichte.....	38
4.12.3. Kapillardurchmesser.....	38
4.12.4. Neoangiogenese-Score.....	38
4.13. Histologie und Immunhistochemie	39
4.13.1. Erstellung der Schnitte	39
4.13.1.1. HE-Färbung.....	39
4.13.1.2. PCNA.....	39
4.13.1.3. Caspase-3.....	40
4.13.2. Auswertung der Schnitte.....	41
4.13.2.1. Tumordinfiltration	41

4.13.2.2. Proliferationsrate	41
4.13.2.3. Apoptoserate	41
4.14. Statistik.....	41
5. Ergebnisse.....	43
5.1. Anzahl, Gewicht und Überleben der Versuchstiere	43
5.2. Wirkung von Temeirolimus auf das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen disseminierten Tumorzellen und Mikrometastasen während Pfortaderastligatur (Versuchsteil A) 43	
5.2.1. Tumorwachstum.....	43
5.2.2. Tumorangiogenese.....	45
5.2.2.1. Angiogenese - Tumorrand	45
5.2.2.2. Angiogenese - Tumorzentrum.....	46
5.2.3. Neoangiogenese-Score.....	48
5.2.4. Tumordinfiltration	49
5.2.5. Tumorzellproliferation	50
5.2.6. Tumorzellapoptose.....	52
5.3. Wirkung von Temeirolimus auf etablierte extrahepatische kolorektale Metastasen während Pfortaderastligatur (Versuchsteil B)	52
5.3.1. Tumorwachstum.....	52
5.3.2. Tumorangiogenese.....	54

5.3.2.1. Angiogenese - Tumorrand	54
5.3.2.2. Angiogenese - Tumorzentrum.....	55
5.3.3. Neoangiogenese-Score.....	56
5.3.4. Tumordinfiltration	58
5.3.5. Tumorzellproliferation	59
5.3.6. Tumorzellapoptose.....	60
6. Diskussion.....	61
6.1. Diskussion der Methoden	61
6.1.1. Rückenhautkammer	61
6.1.2. Pfortaderastligatur	62
6.2. Diskussion der Ergebnisse	63
6.2.1. Einfluss der Pfortaderastligatur auf das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen disseminierten Tumorzellen und Mikrometastasen (Versuchsteil A).....	63
6.2.2. Wirkung von Temsirolimus während Pfortaderastligatur auf das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen disseminierten Tumorzellen und Mikrometastasen (Versuchsteil A)	65
6.2.3. Einfluss der Pfortaderastligatur auf etablierte extrahepatische kolorektale Metastasen (Versuchsteil B).....	66
6.2.4. Wirkung von Temsirolimus während Pfortaderastligatur auf extrahepatische kolorektale Metastasen (Versuchsteil B).....	67
6.3. Schlussfolgerung.....	68

7.	Bibliographie.....	70
8.	Publikationen.....	94
9.	Danksagung.....	95

1. Abkürzungsverzeichnis

DTC	disseminierte Tumorzellen
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
GFP	green fluorescent protein
HGF	hepatocyte growth factor
HNPCCS	hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom-Syndrom
HPF	high power field
IVM	Intravitalmikroskopie
KRK	kolorektales Karzinom
KRLM	kolorektale Lebermetastasen
LAP	Laparatomie
MM	Mikrometastasen
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin – Complex 1
mTORC2	mammalian target of rapamycin – Complex 2
PBE/PVE	portal branch embolization/ portal vein embolisation = Pfortaderastembolisation
PBL	portal branch ligation
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
RHK	Rückenhautkammer
ROI	region of interest
TEM	Temsirolimus
TU Imp	Tumorimplantation

VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
VPLL	linker Ast der <u>V</u> ena <u>p</u> ortae, der den <u>L</u> obus hepatis sinister <u>l</u> ateralis versorgt
VPLM	linker Ast der <u>V</u> ena <u>p</u> ortae, der den <u>L</u> obus hepatis sinister <u>m</u> edialis versorgt

2. Zusammenfassung

2.1. Deutsche Version

Bis zum heutigen Tage ist in der Behandlung von syn- und metachronen kolorektalen Lebermetastasen die Resektion der Goldstandard. Die Pfortaderastligatur ist ein seit vielen Jahren in der Klinik präoperativ eingesetztes Verfahren vor ausgedehnter Leberresektion bei initial inoperablen kolorektalen Lebermetastasen. Durch die Pfortaderastligatur wird eine Atrophie im ligierten Leberlappen und eine Hypertrophie im zukünftigen Restlebergewebe erzielt und somit ein postoperatives Leberversagen aufgrund eines zu geringen Restlebergewebes vermieden. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass die Pfortaderastligatur durch Expression von Wachstumsfaktoren im ligierten Leberlappen zur Entstehung von neuen und zur Größenzunahme von bereits etablierten intrahepatischen Metastasen führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen anhand des Rückenhautkammermodells der Maus intravitalmikroskopisch untersucht, ob die bekannte intrahepatische Hypertrophie induzierende Wirkung der Pfortaderastligatur Einfluss auf das Proliferationsverhalten von extrahepatischen kolorektalen disseminierten Tumorzellen, Mikrometastasen und bereits etablierten extrahepatischen kolorektalen Metastasen hat. Zum anderen sollte geklärt werden, ob der mTOR-Inhibitor Temsirolimus antiangiogene und proliferationshemmende Wirkung während einer Pfortaderastligatur gegenüber extrahepatischen kolorektalen disseminierten Tumorzellen, Mikrometastasen und etablierten extrahepatischen Metastasen entfalten kann.

Die Arbeit konnte zeigen, dass die Pfortaderastligatur keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von extrahepatischen kolorektalen disseminierten Tumorzellen, Mikrometastasen und etablierten Metastasen hat. Die Wirkung des mTOR-Inhibitors

Temsirolimus wird durch eine Pfortaderastligatur nicht beeinträchtigt. Durch die Gabe von Temsirolimus während der Pfortaderastligatur konnte in dieser Arbeit das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen disseminierten Tumorzellen und Mikrometastasen signifikant gehemmt werden. Außerdem wurde durch die Therapie mit Temsirolimus während der Pfortaderastligatur der weitere Progress von bereits etablierten extrahepatischen Tumorzellen aufgehalten.

2.2. Englische Version

To this day excision is the gold standard in the therapy of syn- and metachronic colorectal liver metastases. The portal branch ligation is a procedure preoperatively used for many years in the clinical setting before extensive hepatectomy with initially inoperable colorectal liver metastases. The mTor - inhibitor temsirolimus has potent anti-tumor activities on extrahepatic colorectal metastases. Treatment of patients with advanced colorectal cancer may require portal branch ligation. While portal branch ligation can induce intrahepatic tumor growth, the effect of portal branch ligation on extrahepatic metastases under temsirolimus treatment is unknown.

In the present study, we investigated whether the known intrahepatic hypertrophy-inducing effect of portal branch ligation has an influence on the proliferative behavior of extrahepatic disseminated tumor cells, micrometastases and established extrahepatic colorectal metastases, using the dorsal skinfold chamber model. On the other hand, we examined whether the mTOR - inhibitor temsirolimus can exert its angiogenic and proliferation-inhibitory effect during portal branch ligation against extrahepatic colorectal disseminated tumor cells, micrometastases and established extrahepatic metastases.

In non-portal branch ligation animals temsirolimus treatment inhibited tumor cell proliferation as well as vascularization and growth of the extrahepatic metastases. Portal branch ligation did not influence tumor cell engraftment, vascularization and metastatic growth. By the administration of temsirolimus during portal branch ligation, the growth of extrahepatic colorectal disseminated tumor cells und micrometatstase could be significantly inhibited. In addition, the further progress of already established extrahepatic tumor cells was stopped by the therapy with temsirolimus during portal branch ligation.

3. Einleitung

3.1. Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist das zweithäufigste Karzinom bei Männern und Frauen [56, 125] im europäischen Raum. In Deutschland liegt die Inzidenz für Männer bei ca. 33.740 und für Frauen bei ca. 28.490 pro Jahr [171]. Somit macht das KRK einen Anteil von rund 14 Prozent an allen Krebsneuerkrankungen aus und ist die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland [40, 56]. Das Erkrankungsrisiko steigt mit fortschreitendem Alter stetig an [94]. Mehr als die Hälfte der Betroffenen erkrankt ab dem 70. Lebensjahr, nur etwa 10 Prozent sind jünger als 55 Jahre. Zu den Risikofaktoren zählen Übergewicht, Bewegungsmangel, fettreiche Ernährung, geringer Gemüseverzehr sowie Rauchen und regelmäßiger Alkoholkonsum. Auch Erkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Chron erhöhen das Risiko für ein KRK [171]. Bei ca. 10% der Patienten sind genetische Faktoren wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das hereditäre nicht polypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCCS) und Erkrankungsfälle in der eigenen Familie für die Entstehung des KRK verantwortlich [56].

Das KRK zählt zu den Karzinomen mit mittlerer Prognose, wobei die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 50% liegt [171]. Ohne jegliche Behandlung besteht im Stadium IV (Fernmetastasen vorhanden) jedoch nur eine mittlere Überlebenszeit von ca. 5 bis 6 Monaten [35].

3.2. Kolorektale Metastasen

Das KRK wird aufgrund der verspäteten lymphogenen und hämatogenen Metastasierung als langsam proliferierender Tumor angesehen. Man schätzt die kalkulierte Verdopplungszeit des Primärtumors auf ca. 636 Tage. Bei Lebermetastasen liegt diese jedoch nur noch bei 5 bis 90 Tagen [19]. Da das KRK anfangs nur wenig klinische Beschwerden verursacht, wird der Primärtumor oft erst in einem fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert. So liegen bei ca. 20-25% der Patienten bei Erstvorstellung bereits metastatische Absiedlungen, meist in der Leber, vor [35, 120, 125, 153, 159]. Trotz der in den letzten Jahrzehnten weit voran geschrittenen Behandlungsmethoden entwickeln ca. 50-70% aller Patienten, die eine potentiell kurative R0-Resektion des Primarius erhalten haben, innerhalb der ersten 5 Jahre nach operativer Entfernung, lokal- oder fernmetastatische Rezidive. 10-25% der Patienten, die zusätzlich zur R0-Resektion einen negativen Lymphknotenstatus aufweisen, zeigen im weiteren Verlauf Metastasen. Darüber hinaus liegt die Rezidivrate kolorektaler Lebermetastasen nach 2 Jahren bei ca. 50% [71, 131].

Die Rezidive werden als Folge einer progredienten Mikrometastasierung angesehen, die wahrscheinlich schon zum Zeitpunkt der primären Diagnose okkult, also noch nicht in der Bildgebung oder durch Untersuchungen nachweisbar, vorlag [19, 26, 69, 141, 159]. Laut Definition des American Joint Committee on Cancer (AJCC) [36] werden diese okkulten Metastasen als disseminierte Tumorzellen (DTC) oder Mikrometastasen (MM) bezeichnet. Dabei versteht man unter DTC einzelne Tumorzellen oder Tumorzellcluster mit einem max. Durchmesser von 0,2 mm. MM sind als zusammenhängende Absiedlungen von Tumorzellen mit einem Durchmesser von 0,2 - 2 mm bzw. als nicht zusammenhängende Infiltrate bestehend aus mehr als 200 Tumorzellen definiert. Der klinische Nachweis von lymphatischen MM bzw. DTC oder DTC in Blut oder Peritoneallavage steht in

Zusammenhang mit der Entwicklung eines postoperativen Rezidivs und einem reduzierten krankheitsfreien Gesamtüberleben [21, 22, 85, 131].

Die lymphogenen Metastasierungswege des KRK verlaufen entlang der arteriellen Gefäßversorgung des Rektums bzw. Kolons. Beim Rektumkarzinom hängt sie vom Sitz des Tumors ab. Im oberen Rektumdrittel erfolgt der Lymphabfluss nach kranial, im mittleren Drittel nach kranial sowie über die Lymphknoten der Aa. rectales media et pudenda an den Beckengefäßen entlang. Im distalen Rektumdrittel und im Analbereich wird die Lymphe nach kranial, lateral und inguinal drainiert [20].

Die hämatogene Metastasierung erfolgt zu 75% über die Vena portae in die Leber. Deshalb entwickeln 50% aller Patienten mit KRK synchrone (zeitgleiches Auftreten mit dem Primarius) oder metachrone (Entstehung nach Entfernung des Primärtumors) Lebermetastasen [91]. Lebermetastasen werden für den Tod von 2/3 dieser Patienten verantwortlich gemacht [39, 45, 116, 138, 146].

Die hämatogene Metastasierung kann sich im Anschluss weiter über die Lebervenen in die Lunge (15%) ausbreiten. Seltener finden sich auch Absiedlungen des Primärtumors in Nebenniere, Knochenmark, Gehirn, Milz, Nieren, Pleura, Darm, Ovarien oder Peritoneum [155]. Tief sitzende Rektumkarzinome können auch direkt über die inferiore Vena cava in die Lunge metastasieren [20, 35, 55, 76, 114, 161].

3.3. Pfortaderastligatur

Wie bereits unter 3.2 erwähnt weisen ca. 20% Prozent aller Patienten mit KRK bei Erstdiagnose synchrone Lebermetastasen auf. Weitere 40-50% entwickeln nach R0-

Resektion des Primärtumors metachrone Lebermetastasen [43, 116] Bis zum heutigen Tag ist in der Behandlung von kolorektalen syn- oder metachronen Lebermetastasen die R0-Resektion der Goldstandard [10, 60, 95, 103, 113, 116, 117, 163]. So kann am ehesten eine kurative Situation erzielt und die 5-Jahres-Überlebensrate auf ca. 50% bzw. die 10-Jahres-Überlebensrate auf ca. 20% gesteigert werden [4, 28, 84, 92, 118].

Primär sind nur ca. 15-20% aller Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen für eine Resektion geeignet [68, 103, 116, 130]. Grund hierfür ist meist die multifokale Tumorausbreitung innerhalb der Leber, die Invasion von großen Gefäßen und biliären Strukturen oder die zu gering geschätzte Menge an verbleibendem gesundem regenerationsfähigem Parenchym nach ausgedehnter Leberresektion [9, 68, 79, 90, 92, 103, 104, 121, 130]. Um einer postoperativen Leberinsuffizienz/-dysfunktion vorzubeugen bzw. um eine adäquate Regenerationsrate erreichen zu können, sollte bei Patienten mit normaler Leberfunktion nach Hepatektomie noch mindestens 20-25%, bei Patienten mit vorgeschädigter Leber noch ca. 30% und bei Patienten mit gut kompensierter Zirrhose noch etwa 40% funktionsfähiges Leberparenchym vorhanden sein [1-3, 24, 30, 72, 92, 106, 169]. Eine mehr als 70%ige Leberresektion erhöht das Risiko eines Leberversagens sowie die postoperative Mortalität [61, 87, 140].

Damit Patienten, die einer ausgedehnten Lebermetastasenresektion bedürfen und aufgrund eines zu gering geschätzten Restlebergewebes primär als nicht resektabel eingestuft werden, die Chance auf einen kurativen Therapieansatz haben, hat man unter anderem die Technik der Pfortaderastokklusion entwickelt [16, 23, 29, 96, 105, 107, 108]. Dieser Pfortaderastverschluss kann entweder als perkutane transluminale Embolisation (PBE) oder als chirurgische Ligatur (PBL) durchgeführt werden. Welche Methode letztendlich zur Anwendung kommt hängt von der chirurgischen Strategie ab. Die PBE wird eher bei einer

einzeitigen und die PBL bei einer zweizeitigen Hepatektomie eingesetzt, wobei in den bisherigen Studien beide Techniken vergleichbare Ergebnisse zeigten [14, 33, 92]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Technik der Pfortaderastligatur (PBL) verwendet, so dass im nachfolgenden Text die PBL ausführlicher beschrieben wird.

Ziel einer PBL ist es, präoperativ mittels Unterbindung der portalvenösen Zirkulation in dem zu resezierenden und mit Metastasen durchsetzten Leberareal eine Atrophie sowie gleichzeitig eine Hypertrophie im zukünftigen Restlebergewebe zu erreichen. Durch die PBL wird das verbleibende gesunde Leberparenchym zur Größenzunahme stimuliert und die generelle Regenerationsfähigkeit der Leber ausgetestet [16, 59, 67, 68, 92, 96, 119, 152]. Zudem erreicht man eine Zunahme der Stoffwechselaktivität im zukünftigen Restlebergewebe [1, 59, 67, 152]. Ist durch die PBL im verbleibenden gesunden Leberparenchym eine ausreichende Hypertrophie und Stoffwechselkapazität erzielt worden, so kann die vorher aufgrund der Gefahr eines postoperativen Leberversagens nicht praktikable Hepatektomie sekundär durchgeführt werden.

In einem Patientenkollektiv mehrerer retrospektiver Studien wurde bei 27-63% der Patienten mit primär nicht resektablen kolorektalen Lebermetastasen eine PBL durchgeführt. In 60-82% der Fälle war nach PBL aufgrund ausreichend provozierter Hypertrophie eine sekundäre Resektion der Metastasen möglich [32, 92, 93, 106, 110, 112, 162]. Bei Patienten, die nach erfolgter PBL mehr als 20% Leberrestgewebe aufweisen, ist die Gefahr des postoperativen Leberversagens nicht größer als bei Patienten die ohne PBL mehr als 20% verbleibendes Leberparenchym haben [1].

Allerdings konnte in unterschiedlichen Studien gezeigt werden, dass es bereits nach 45 min Ischämie und anschließender Reperfusion nicht nur zu einem Leberzellschaden, sondern auch zum beschleunigten Wachstum von kolorektalen MM sogar im ligierten Leberlappen

kommt [23, 124, 154]. Des Weiteren konnte nach initialer Leberischämie und anschließender Reperfusion eine Zunahme der VEGF-Expression nachgewiesen werden [148].

3.4. Die mTOR-Inhibitoren Rapamycin und Temsirolimus

Der ursprünglich entdeckte mTOR-Inhibitor ist Rapamycin. Rapamycin ist als Produkt des Bakteriums *Streptomyces hygroscopicus* ein natürliches Makrolidantibiotikum (Sirolimus/Rapamune, ® Wyeth). Es wurde durch Forscher der Firma Wyeth aus einer Bodenprobe der Osterinseln (Rapa Nui) isoliert. [6, 49, 53, 135].

Initial konnte für Rapamycin eine ausgeprägte antimykotische [41, 134, 135, 156] und immunsuppressive [15, 41, 74, 99, 129, 133] Wirkung nachgewiesen werden [34, 49, 135]. Seine erste Zulassung erhielt Rapamycin als Immunsuppressivum nach allogener Organtransplantation [13, 17, 41, 58, 158, 167].

Seit der Erkenntnis über die potente antiproliferative und wachstumshemmende Wirkung von Rapamycin auf die menschliche Tumorzelle begann die intensive Erforschung von Rapamycin hinsichtlich klinisch einsetzbarer Tumorthherapie. Es folgte die Entwicklung von drei Rapamycin-Derivaten: Temsirolimus, Everolimus und Deforolimus. Diese sogenannten „rapamycins“ oder „rapalogs“ sind Rapamycin-Derivate der ersten Generation und haben denselben Funktionsmechanismus wie Rapamycin. [6, 17, 41, 47, 49, 63, 132].

Rapamycin und seine Derivate wirken über die Hemmung von mammalian target of rapamycin (mTOR). mTor ist eine Serin-Threonin-Kinase des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges (PI3K/Akt) [49, 132, 158] und katalytische Untereinheit der biochemisch unterschiedlichen mTORC1- und mTORC2- Komplexe, die Teil des PI3K/AKT/mTOR –

Signalweges sind. Über diese beiden Komplexe integriert mTOR Signale sowohl von Wachstumsfaktoren als auch von Nährstoff- und Energieangebot in den PI3K/AKT/mTOR – Signalweg und nimmt so Einfluss auf Wachstum, Proliferation, Überleben und Mobilität der Tumorzellen [17, 41, 42, 48, 49, 52–54, 73, 86, 97, 127, 128, 151, 158, 165]. Dysregulation einiger Komponenten des PI3K/AKT/mTOR - Signalweges führt in diversen menschlichen Tumoren zum Progress [5, 15, 17, 27, 38, 41, 62, 98, 115, 122, 157].

Die Hemmung von mTOR durch Rapamycin erschwert Angiogenese und endotheliale Zellproliferation in vitro und in vivo. Rapamycin führt zur Abnahme der endothelialen Zellproliferation unter Hypoxie, zur Abnahme der vascular endothelial growth factor (VEGF)-Produktion und zu einer verminderten Antwort der endothelialen Gefäße auf VEGF-Stimulation [49, 51, 65, 66].

In dieser Arbeit wurde der mTor-Inhibitor Temsirolimus (Torisel ®, Wyeth) verwendet. Temsirolimus (TEM) ist ein Dihydroxymethyl-Propionsäure-Ester-Prophearmakon von Rapamycin. Temsirolimus ist besser wasserlöslich als Rapamycin und wird intravenös verabreicht. Nach Injektion kommt es zur raschen Umwandlung des Prophearmakons in Rapamycin, so dass die Hauptwirkung des Medikaments von Rapamycin ausgeht [17, 49]. In vielen präklinischen und klinischen Studien konnte bereits eine potente Wirkung von Temsirolimus gegenüber Tumoraktivität gezeigt werden [158]. Temsirolimus wird mittlerweile standardmäßig in der Therapie des metastatierten Nierenzellkarzinoms und des Mantelzelllymphoms eingesetzt [15, 41, 53, 57, 64, 102, 158].

Ähnliche Wirkung zeigten die “rapalogs” gegenüber anderen Lymphomtypen [11, 143, 158, 164]. Außerdem wird in mehreren Phase-II-Studien die Wirkung der Rapamycin-Derivate gegenüber Sarkomen, Endometriumkarzinomen und anderen fortgeschrittenen soliden Tumoren evaluiert. [25, 31, 142].

3.5. Zielsetzung der Arbeit

Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass während der PBL und somit noch vor geplanter Leberteilresektion durch Zunahme des arteriellen Blutflusses im ligierten Leberlappen und vermehrte Wachstumsfaktorexpression ein beschleunigtes Wachstum intrahepatischer (Mikro-)Metastasen im ligierten und nicht ligierten Leberlappen beobachtet werden kann [79, 124].

Bisher wurde nicht untersucht wie sich die intrahepatisch proliferationsfördernde Wirkung der PBL auf extrahepatische kolorektale DTC/MM und etablierte Metastasen auswirkt und ob die proliferationsfördernde Wirkung der PBL durch systemische Gabe von TEM reduziert werden kann.

So sollen durch diese Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie wirken sich die Einflüsse der PBL auf das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen DTC/MM aus (Versuchsteil A)?
2. Kann die systemische Gabe von TEM während PBL das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen DTC/MM verhindern (Versuchsteil A)?
3. Wie wirken sich die Einflüsse der PBL auf bereits etablierte extrahepatische kolorektale Metastasen aus (Versuchsteil B)?
4. Kann die systemische Gabe von TEM während PBL den Progress etablierter extrahepatischer kolorektaler Metastasen verhindern (Versuchsteil B)?

4. Material und Methoden

Die Versuche wurden durch die Ethikkommission des Ministeriums für Soziales, Gesundheit, Frauen und Familie genehmigt (Antrag-Nummer 52/10). Zudem erfolgte eine Überwachung der Experimente durch die Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlandes Frau Dr. Monika Frings.

4.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden 20-22g schwere, weibliche BALB/c – Mäuse von Charles River Laboratories, Research Models and Services, Sulzfeld Deutschland GmbH, verwendet. Die Mäuse wurden in den Stallungen des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes unter kontrollierten Bedingungen gehalten. Vor Versuchsbeginn befanden sich 10 Mäuse in einem Käfig. Ab dem Tag vor Rückenhautkammerimplantation bis zum Versuchsabbau lebten die Tiere in Einzelkäfigen. Die Mäuse hatten stets freien Zugang zu Wasser und Nahrung (Standard Laborfutter, Altromin®, Lage, Deutschland). Es herrschte eine durchschnittliche Raumtemperatur von 22-24°C und eine Luftfeuchtigkeit von 60-65%. Zudem wurde eine 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmik eingehalten. Gewicht, Fellbeschaffenheit sowie das Verhalten der Versuchstiere wurde täglich kontrolliert und dokumentiert.

4.2. Anästhesie

Vor jedem operativen Eingriff sowie vor jeder Intravitalmikroskopie (IVM) wurde den Mäusen ein Narkosegemisch bestehend aus Xylazinhydrochlorid (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen Deutschland; je 20mg/kg Körpergewicht) und Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Parke Davis, Freiburg, Deutschland; je 90mg/kg Körpergewicht) auf 10ml 0,9%ige Kochsalzlösung verdünnt, intraperitoneal injiziert. So wurde eine ca. 30-40 minütige tiefe Vollnarkose der Tiere herbeigeführt. Während jeder Narkose wurde den Mäusen prophylaktisch, um ein Austrocknen der Cornea zu vermeiden, Augensalbe lokal appliziert (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach - Wyhlen, Deutschland). Bis zum Erwachen aus jeder Narkose wurden die Tiere zur Vorbeugung einer Hypothermie mit Rotlichtwärmelampen (IR 801 100W, efbe Elektrogeräte GmbH, Bad Blankenburg, Deutschland) bestrahlt.

4.3. Implantation der Rückenhautkammer

Das Modell der Rückenhautkammer in Kombination mit der Technik der Intravitalmikroskopie ist ein standardisiertes und etabliertes Versuchsmodell. Am Institut für experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes wurde es bereits in einer Vielzahl von Studien eingesetzt, z. B. [80, 81, 88, 123, 136]. Sandison legte für dieses Verfahren in den 1920igern den Grundstein [126]. Durch Anwendung dieses Modells ist es möglich Mikrovaskularisierung und -zirkulation im Allgemeinen, vor allem aber die Erforschung von Wachstum und Mikrovaskularisierung transplanteder neoplastischer und nicht neoplastischer Gewebe in vivo, also am lebenden Tier, zu beobachten [89]. Dadurch ist eine

viel realistischere Erforschung komplexer physiologischer und pathophysiologischer Abläufe als durch in vitro Versuche möglich [101].

Die Implantation der Rückenhautkammern wurde wie folgt durchgeführt [100]:

Nach Wirkungseintritt der Narkose wurden die Tiere zunächst mit einem elektrischen Haarschneider (Elektra II GH 204, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) am Rücken rasiert und zusätzlich mit Enthaarungscreme (Plica med Creme, Asid Bonz, Böblingen) vollständig von Körperbehaarung befreit. Danach erfolgte die Reinigung mit lauwarmem Wasser.

Die anschließende Präparation wurde in Bauchlage durchgeführt. Zunächst wurde die elastische Rückenhaut in der Mittellinie des Rückens zu einer Falte mobilisiert. Die dadurch entstandene Duplikatur der Rückenhaut wurde unter Gegenlichtkontrolle so zur Deckung gebraucht, dass die Gefäße der beiden Hautfaltenanteile direkt übereinander zum Liegen kamen. Anschließend wurde die Rückenhautfalte mit zwei Haltefäden senkrecht an einer Querstange aufgehängt, um ausreichend Spannung der Haut zu erhalten. Dann wurde der hintere Anteil der aus zwei symmetrischen Titanrahmen bestehenden Rückenhautkammer mit mehreren Einzelstichnähten an der Oberkannte der Hautfalte, jedoch kaudal der Versorgungsgefäße, befestigt. An der Hautfaltenbasis wurde für den Durchtritt zweier Verbindungsschrauben je ein kleiner Schnitt gesetzt. So konnten die Schrauben von der Rahmenhinterseite nach vorne geführt und anschließend mit Klemmen fixiert werden. Als nächstes wurde, weiterhin unter Kontrolle mit Gegenlicht, der Bereich des zukünftigen Beobachtungsfensters markiert.

Für die folgenden Arbeitsschritte wurden schließlich die vorher angebrachten Haltefäden entfernt und die Mäuse in Rechtsseitenlage manövriert. Mit Hilfe eines Operationsmikroskops (Leica, Bensheim, Deutschland) und mikrochirurgischen Instrumenten

konnten nun innerhalb des markierten Bereichs Haut, Hautmuskulatur, Faszien-, Fettgewebe und die beiden Schichten des M. retractor entfernt und der gegenüber liegende quergestreifte Hautmuskel freipräpariert werden. Zum Schutz des Gewebes vor Austrocknung und zur evtl. notwendigen Blutstillung erfolgten mehrere Spülungen mit 0,9%iger Kochsalzlösung (Braun, Melsungen, Deutschland).

Im Anschluss wurde der vordere Titanrahmen mit einem Abstand von ca. 400-450 µm zum hinteren Rahmen auf die Verbindungsschrauben aufgesetzt, die Klemmen entfernt und die Schrauben mit Muttern festgezogen. Dann erfolgte unter Vermeidung von Blasenbildung das Aufsetzen eines Deckglases auf das Beobachtungsfenster. Anschließend wurde das Deckglas mit einem Spannring fixiert.

Zur Regeneration nach Anästhesie und Kammerimplantation wurde den Mäusen eine Pause von 48 Stunden gewährt. Die Tiere tolerierten die Kammern sehr gut, was sich in unverändertem Trink-, Fress- und Allgemeinverhalten sowie in beibehaltener Tag-/Nacht-Rhythmik und guter Fellbeschaffenheit äußerte.

4.4. Laparatomie

Zu Beginn des Eingriffs wurden die Tiere über dem distalen Thoraxdrittel und dem Abdomen mit einem elektrischen Rasiergerät rasiert (Elektra II GH 204, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und dann mit einem Desinfektionsmittel (Softasept® N, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Für eine adäquate Lagerung wurden die Mäuse in Rückenlage mit gestreckten Extremitäten per Klebeband (Leukosilk® 10mm, Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland) auf einer Korkunterlage befestigt.

Während der gesamten Operation wurde ein Operationsmikroskop (Leica M 651, Leica Camera AG, Solms, Deutschland) verwendet, das mit einer Kamera (Leica IC A, Leica Camera AG), einem Monitor (RM-W100 Sony Trinitron, Sony Deutschland GmbH, Köln, Deutschland) sowie einem DVD-Anschluss verbunden war.

Dann erfolgte die schrittweise Eröffnung der Bauchhöhle über eine mediane Laparatomie. Zunächst wurde die Haut des Abdomens mit einer groben Schere durchtrennt und dann die Linea Alba mit einer feinen Schere eröffnet. Im Anschluss wurden beiderseits des Xyphoids die Bänder entfernt. Die durch die Laparatomie entstandenen zwei Bauchdeckenlappen wurden nun mit je einem Klemmchen lateral des Abdomens über ca. 5mm hohe Klötzchen aufgespannt. So wurde eine Höhenregulierung der Bauchdecke gewährleistet. Dann wurde das Xyphoid mit einem dritten Klemmchen über den Kopf der Tiere aufgespannt.

Im folgenden Schritt wurden die Bänder der Lobi hepatis sinister lateralis und medialis, sowie das Ligamentum falciforme hepatis (Band zwischen Lobus hepatis sinister medialis und Zwerchfell) und das Ligamentum triangulare sinisterum (Band zwischen Lobus hepatis sinister lateralis und Zwerchfell) mittels einer Mikroschere durchtrennt.

Alle Lokalisationsangaben sind aus der Sicht der Tiere beschrieben. Angaben zum Lobus hepatis sinister lateralis gehen vom umgedrehten Lappen aus.

Zur Vermeidung von Parenchymverletzungen wurden zur Präparation feuchte Wattestäbchen benutzt (Wattestäbchen (kleiner Kopf), Fink & Walter GmbH, Merchweiler, Deutschland).

Nach durchgeführter Operation wurde in das noch geöffnete Abdomen ca. 1ml NaCl appliziert. Leberlappen, Magen, Milz und Darm wurden an ihren anatomisch korrekten Platz repositioniert.

Anschließend erfolgte der Bauchdeckenverschluss mit 5-0 Prolene (5-0, C-1, blau monfil, Pronova™, Ethicon GmbH).

4.5. Pfortaderastligatur

Der Zugang zum Operationssitus erfolgte wie bei der unter Punkt 4.4. beschriebenen Laparatomie.

Zur Durchführung des Ligaturvorganges wurden zunächst unter 40-facher Vergrößerung des Operationsmikroskopes (Leica M 651, Leica Camera AG, Solms, Deutschland) die jeweiligen Äste der Pfortader aufgesucht und dargestellt. Um Parenchymverletzungen und –blutungen zu vermeiden wurde mit absoluter Vorsicht und unter zu Hilfenahme von feuchten Wattestäbchen (Wattestäbchen (kleiner Kopf), Fink & Walter GmbH, Merchweiler, Deutschland) gearbeitet.

In dieser Arbeit erfolgte die Pfortaderastligatur am Lobus hepatis sinister lateralis [78, 79]. Der linke laterale Leberlappen erhält Zufluss aus der linken Vena portae (VPLL). Über portal-portale beziehungsweise portal-venöse Verbindungen kann die Blutversorgung des Lobus hepatis sinister lateralis retrograd über den Lobus hepatis sinister medialis erfolgen (VPLM). So wurden zur Unterbindung des portalvenösen Blutflusses im Lobus hepatis sinister lateralis zum einen der Ast der linken Vena portae, der den Lobus hepatis sinister lateralis (VPLL) versorgt und zusätzlich der Ast der linken Vena portae, der den Lobus hepatis sinister medialis (VPLM) versorgt, per Durchstichligatur mit einem Faden der Stärke 9-0 (Ethilon, 0,3 metric BV-4 ; Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

In den Kontrollgruppen wurden die oben beschriebenen Gefäße frei präpariert, jedoch nicht ligiert.

Nach anatomischer Reposition der Organe erfolgte der Bauchdeckenverschluss mit 5-0 Pro-lene® (5-0, C-1, blau monfil, Pronova™, Ethicon GmbH).

Nach der Operation wurden die Tiere zur Schmerzlinderung mit 40mg Tramadol in 100ml Trinkwasser versorgt.

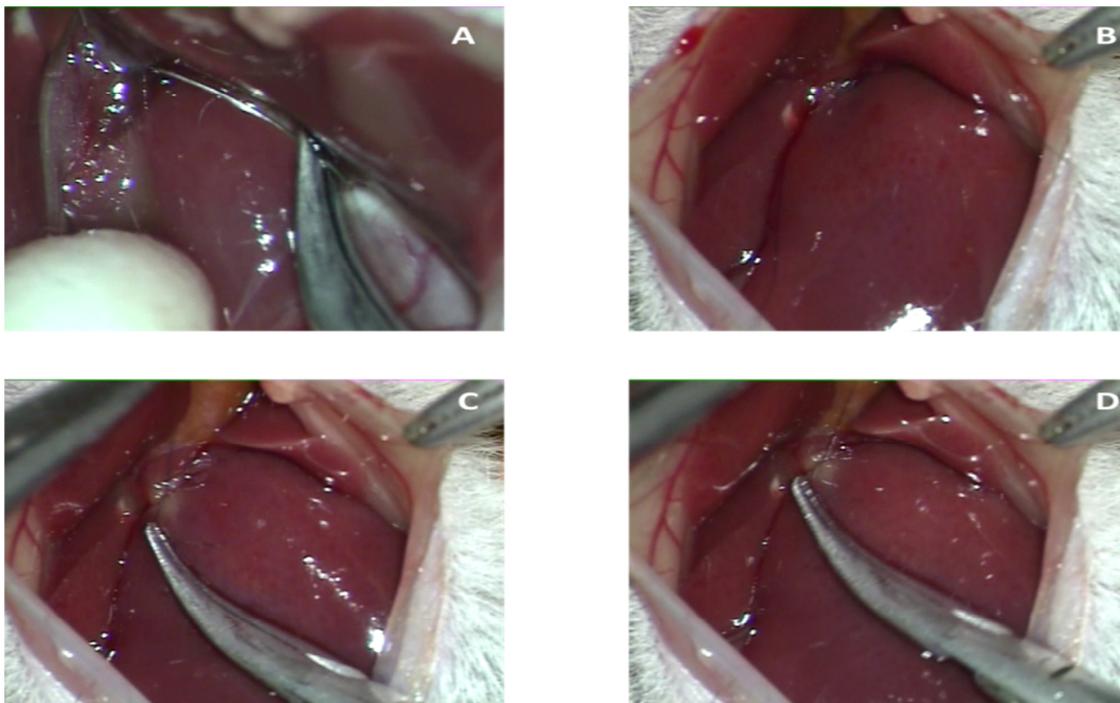


Abb. 1: Pfortaderastligatur im Mausmodell

4.6. Tumorzellaufbereitung

In dieser Arbeit wurde eine bereits am Institut für Experimentelle Chirurgie und in diversen anderen Studien etablierte Tumorzelllinie eingesetzt. Hierbei handelt es sich um green fluorescent protein (GFP) - transfizierte Tumorzellen der Kolonkarzinomzell-Linie CT26.WT (ATCC CRL-2638®, LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland). Die Zelllinie stammt von

einem N-Nitroso-N-Methylurethan-induzierten, undifferenzierten Adenokarzinom des Kolons ab und ist syngen zur BALB/c-Maus [82, 83, 123, 150, 170].

Die Anzüchtung der Tumorzellen erfolgte analog zu am Institut für Experimentelle Chirurgie vorangegangenen Arbeiten [83]. Die Tumorzellen wurden in Zellkultur als Monolayer in RPMI-1640 Medium mit 2 mM L-Glutamin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 10%igem fetalem Kalbsserum (FCS-Gold, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories GmbH) bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert [83].

Vor Implantation wurden die Tumorzellen mit Hilfe von 0,05%iger Trypsinlösung von den Kulturschalen abgelöst und anschließend zentrifugiert. Dann erfolgte nach Anfärbung mit Trypanblau (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA, PAA Labor GmbH) und zweimaliger Spülung mit PBS die Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer. Es wurden jeweils 1×10^5 Tumorzellen implantiert.

4.7. Tumorzellimplantation

Vor der Implantation der CT26.WT-GPF-Tumorzellen in die Rückenhautkammer erfolgte deren Aufbereitung im Labor. Der genaue Ablauf der Aufbereitung ist unter Punkt 4.6. beschrieben. Die Behandlung der Tumorzellen wurde direkt vor der Implantation durchgeführt um die Teilungsfähigkeit der Zellen zu garantieren. Die Implantation erfolgte an Versuchstag Null.

Zu Beginn des Vorgangs wurden der Spannring und das Deckglas der Rückenhautkammer abgenommen. Dann wurde der aufbereiteten Zellsuspension mit einer Eppendorfpipette ein Volumen von 2µl (= 1×10^5 Tumorzellen) abpipettiert. Diese Tumorzellsuspension wurde

anschließend per Pipette im oberen Drittel des Beobachtungsfensters der Kammer direkt auf den quergestreiften Hautmuskel aufgetragen. Dabei wurde darauf geachtet die Tumorzellen standardisiert mittig innerhalb des Fensters zu applizieren. Im letzten Schritt wurde das Beobachtungsfenster unter Vermeidung von Blasenbildung mit einem neuen Deckglas, sowie mit dem Spannring wieder verschlossen.

Anschließend erfolgte die erste intravitalmikroskopische Aufnahme, um die initiale Ausdehnung des Tumors zu dokumentieren.

4.8. Intravitalmikroskopie

Um die Tiere dem Vorgang der Intravitalmikroskopie (IVM) unterziehen zu können, wurden sie zunächst wie bereits unter Punkt 4.2. beschrieben in Narkose versetzt. Nach Wirkungseintritt der Narkose erfolgte eine Mehrpunktfixierung der Mäuse in Rechtsseitenlage auf einer vorgefertigten Plexiglasunterlage. Die Fixierung erfolgte mit einem Faden über die Verbindungsschrauben der Rückenhautkammer. Auf der Plexiglasunterlage war mittig ein leicht erhöhtes Podest eingearbeitet, um die Rückenhautkammer immer identisch in der Waagrechten befestigen zu können. Durch die oben beschriebene Fixierung der Rückenhautkammer auf dem Podest war es möglich den Tumor durch das Beobachtungsfenster bei jeder IVM in gleicher waagrechter Position, unter fast gänzlichem Ausschluss der tierischen Atemexkursionen und ohne ein Verrutschen, zu mikroskopieren.

Die so auf der Plexiglasunterlage fixierte Maus wurde auf den Objektträgertisch des Mikroskops gelegt und das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer unter dem Objektiv positioniert.

Die IVM erfolgte mit einem modifizierten Zeiss Axio-Tech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Als Lichtquelle fungierte eine 100W HBO Quecksilberdampfampe (HBO 100W; Osram Augsburg, Deutschland), die an ein FluoArc-Steuersystem (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) zur Regulation der Helligkeit der Auflichtbeleuchtung angeschlossen war. Durch den im Mikroskop vorhandenen Blaulicht-Filter (450-490nm Exzitations- und >520 nm Emissionswellenlänge) konnten die GFP-transfizierte Tumorzellen gut sichtbar gemacht werden.

Zusätzlich war das Mikroskop mit einer hochempfindlichen Charge-Couple-Device-Kamera (FK 6990, COHU, Prospective Measurements Inc., San Diego, CA, USA), einem TV-Gerät und einem DVD-Recorder (Samsung DVD-HR775; Seoul, Südkorea) verbunden. So konnten der Tumor und sämtliche Neoangiogeneseparameter auf DVD aufgezeichnet und zu einem späteren Zeitpunkt offline an einem Computer mit einem speziell dafür entwickeltem Programm (CapImage, Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) wieder abgespielt und ausgewertet werden.

Entsprechend der unten aufgeführten Abbildung (Abb. 2) wurden die vorher definierten Regions of Interest (ROI) zu jedem Untersuchungszeitpunkt mikroskopiert. Zunächst wurde eine Übersichtsaufnahme in 4-facher Vergrößerung (Objektiv: UPlanFI, Olympus, Japan, n. A. 0,13) zur Bestimmung der Tumorgroße aufgenommen. Dann folgten 8 weitere Aufnahmen des Tumors in 20-facher Vergrößerung mit einem Wasserimmersionsobjektiv (Achromplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland, n. A. 0,5). Es wurden jeweils vier Aufnahmen des Tumorrandes (kranial: A, kaudal: B, rechts lateral: C, links lateral: D) und weitere vier Aufnahmen des Tumorzentrums (E-H) zur Dokumentation der Tumorneoangiogenese erstellt. Die IVM-Aufzeichnungen wurden an Tag 0, 5, 8, 11 und 14 nach Tumorzellimplantation durchgeführt.

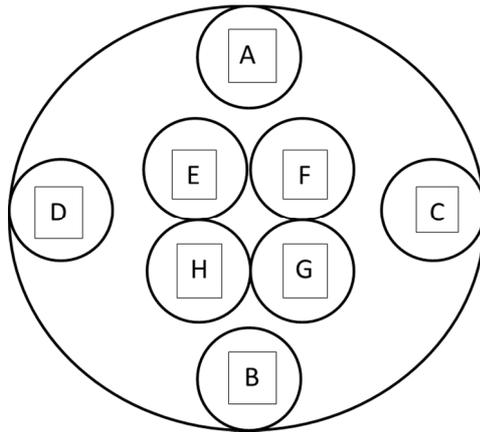


Abb. 2: Schematische Darstellung der Abfolge der Intravitalmikroskopie in 20facher Vergrößerung, A-H = regions of interest = ROI

4.9. Applikation des Therapeutikums

Alle Tiere, die einer TEM-Gruppe zugeordnet waren, erhielten ab Tag 0 (Versuchsteil A) bzw. ab Tag 5 (Versuchsteil B) täglich bis zum Versuchsende (Tag 14) per intraperitonealer Injektion ein Gemisch bestehend aus 1,5 µl Temsirolimus (Torisel®, Pfizer Pharma GmbH, Deutschland) und 2,25 µl eines Verdünnungsmittels, das wiederum verdünnt auf 0,2 ml NaCl, appliziert wurde.

Den übrigen Tieren wurde anstelle des Therapeutikums 0,2 ml Phosphat buffered saline (PBS) intraperitoneal verabreicht.

4.10. Versuchsabbau

An Tag 14 wurden die Versuche nach durchgeführter IVM beendet. Unter wirkender Narkose wurde den Tieren manuell eine HWS-Fraktur zugefügt, die schnell zum Exitus führte. Im Anschluss wurde die Leber entnommen und mit einer Analysewaage (Analytical Plus, OHAUS GmbH Gießen, Deutschland) gewogen. Es wurde das Gesamtgewicht sowie das

Gewicht des linken Leberlappens ermittelt. Dann wurde die Leber zunächst in Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Im nächsten Schritt erfolgte die Entfernung des vorderen Rahmens der Rückenhautkammer inklusive Spannring und Deckglas um direkten Zugriff zum Tumor zu haben. Der Tumor wurde mit einem Skalpell aus der Rückenhaut mit genügend Abstand exzidiert, auf einer dünnen Korkplatte aufgespannt und anschließend halbiert. Eine Hälfte wurde in Tissue Freezing Medium (Jung, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) eingebettet, zuerst schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Die zweite Hälfte wurde in 4%igem Formalin (Roti-Histofix 4%®, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) für 48 Stunden in sog. Einbettkassetten (Einbettkassette mit Deckel, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) konserviert.

4.11. Versuchsprotokoll

Für die Experimente wurden die Tiere in folgende Gruppen randomisiert:

Versuchsteil	Gruppe	Operation		Therapie				Zahl der Versuchs-Tiere (n)
		Pfortaderastligatur (PBL)	Laparatomie (LAP)	Temsirolimus (TEM)		Phosphat bufferd saline (PBS)		
				d0	d5	d0	d5	
A	A-CON		X			X		8
A	A-TEM		X	X				8
A	A-PBL	X				X		8
A	A-PBL/TEM	X		X				8
B	B-CON		X				X	6
B	B-TEM		X		X			7
B	B-PBL	X					X	5
B	B-PBL/TEM	X			X			8

Abb. 3: Versuchsprotokoll

Der Ablauf der Versuche stellte sich folgendermaßen dar:

Allen Tieren wurde an Tag -2 eine Rückenhautkammer implantiert. Im Anschluss folgte in allen Gruppen an Tag -1 in eine Erholungsphase. An Tag 0 wurden alle Tiere operiert. Die Tiere der Gruppen A-CON, A-TEM, B-CON und B-TEM erhielten eine Laparatomie (LAP) und fungierten bzgl. der Operation als Kontrolle. Die Tiere der Gruppen A-PBL, A-PBL/TEM, B-PBL und B-PBL/TEM wurden am Pfortaderast ligiert (PBL). An Tag 0 erfolgte zudem in allen Gruppen die Implantation der Tumorzellen in die Rückenhautkammern. An den Tagen 0, 5, 8, 11 und 14 wurde der jeweilige Entwicklungsstand der implantierten Tumorzellen per Intravitalmikroskopie dokumentiert. Alle Experimente wurden an Tag 14 beendet. Die zeitlichen Abläufe der einzelnen Gruppen sind in den Abbildungen 4 – 11 dargestellt.

Im **Versuchsteil A** wurden alle Tiere **ab Tag 0** therapiert. Die in die Rückenhautkammer implantierten Tumorzellen dieses Versuchsteils stehen für extrahepatische kolorektale DTC bzw. für noch nicht etablierte extrahepatische kolorektale Mikrometastasen.

Gruppe A-CON:

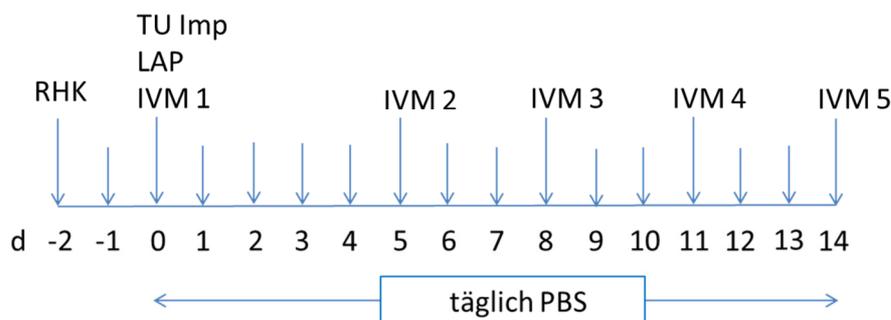


Abb. 4: Gruppe A-CON: Laparatomie (LAP) an Tag 0, Therapie mit Phosphat-buffered-saline (PBS) ab Tag 0.
RHK = Rückenhautkammer, TU Imp = Tumorimplantation, IVM = Intravitalmikroskopie.

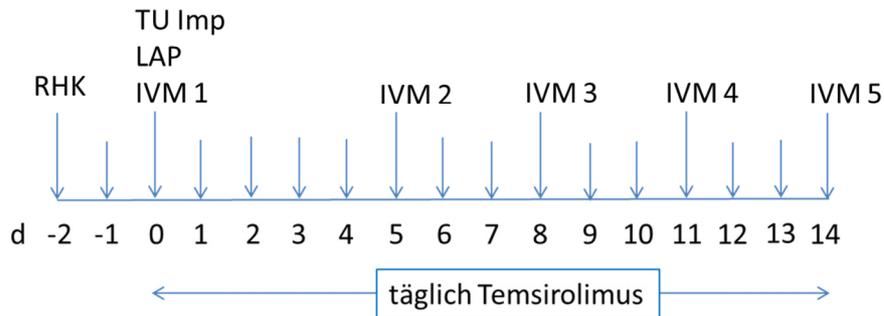
Gruppe A-TEM:

Abb. 5: Gruppe A-TEM: Laparatomie (LAP) an Tag 0, Therapie mit Temsirolimus ab Tag 0.

RHK = Rückenhautkammer, TU Imp = Tumorimplantation, IVM = Intravitalmikroskopie.

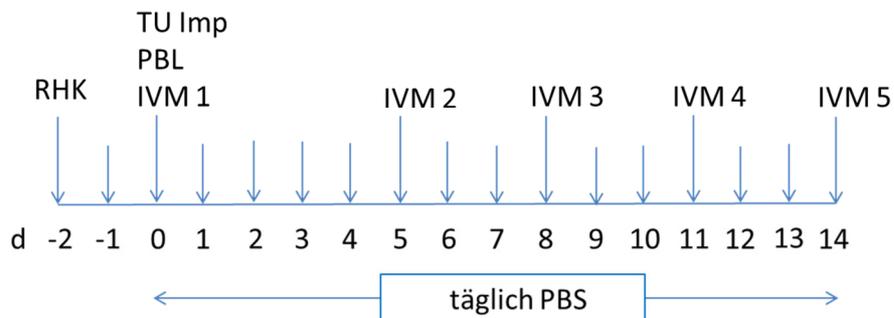
Gruppe A-PBL:

Abb. 6: Gruppe A-PBL: Pfortaderastligatur (PBL) an Tag 0, Therapie mit Phosphat-buffered-saline (PBS) ab Tag 0.

RHK = Rückenhautkammer, TU Imp = Tumorimplantation, IVM = Intravitalmikroskopie.

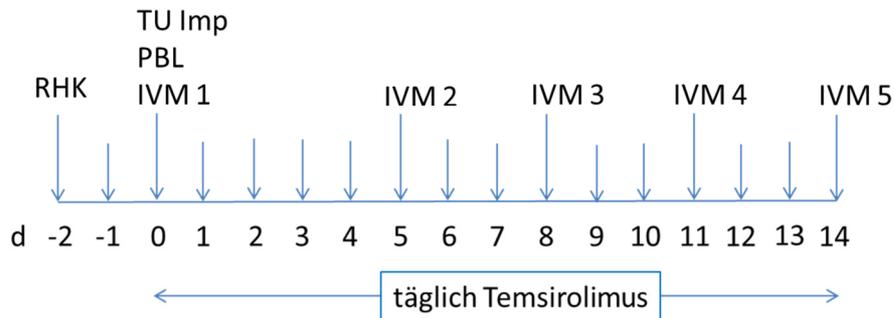
Gruppe A-PBL/TEM:

Abb. 7: Gruppe A-PBL/TEM: Pfortaderastligatur (PBL) an Tag 0, Therapie mit Temsirolimus ab Tag 0.

RHK = Rückenhautkammer, TU Imp = Tumorimplantation, IVM = Intravitalmikroskopie.

Im **Versuchsteil B** wurden alle Tiere **ab Tag 5** therapiert. Die in die Rückenhautkammer implantierten Tumorzellen dieses Versuchsteils stehen für bereits etablierte, also schon „angewachsene“, extraheptische kolorektale Metastasen.

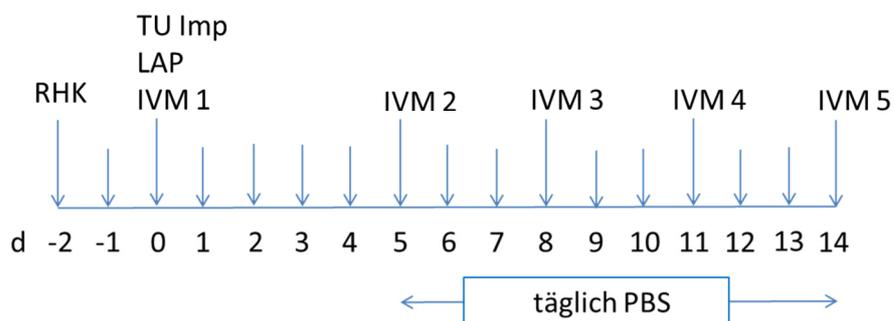
Gruppe B-CON:

Abb. 8: Gruppe B-CON: Laparatomie (LAP) an Tag 0, Therapie mit Phosphat-buffered-saline (PBS) ab Tag 5.

RHK = Rückenhautkammer, TU Imp = Tumorimplantation, IVM = Intravitalmikroskopie.

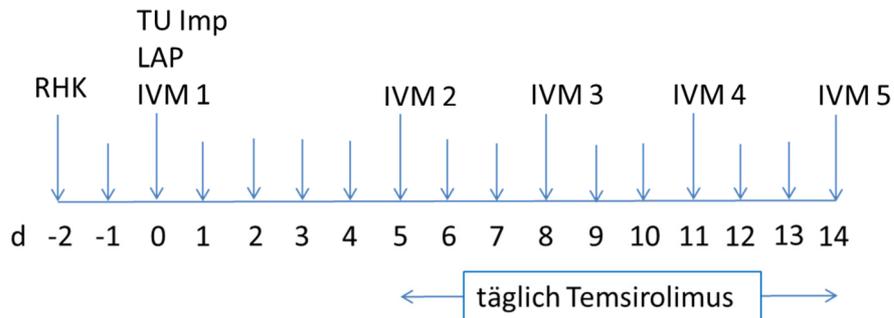
Gruppe B-TEM:

Abb. 9: Gruppe B-TEM: Laparatomie (LAP) an Tag 0, Therapie mit Temsirolimus ab Tag 5.

RHK = Rückenhautkammer, TU Imp = Tumorimplantation, IVM = Intravitalmikroskopie.

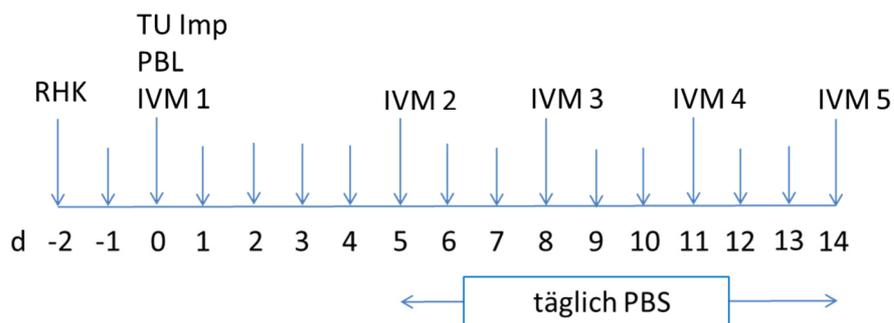
Gruppe B-PBL:

Abb. 10: Gruppe B-PBL: Pfortaderastligatur (PBL) an Tag 0, Therapie mit Phosphat-buffered-saline (PBS) ab Tag 5.

RHK = Rückenhautkammer, TU Imp = Tumorimplantation, IVM = Intravitalmikroskopie.

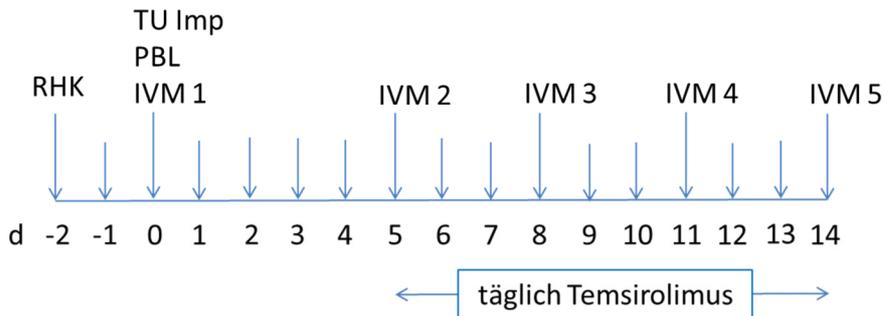
Gruppe B-PBL/TEM:

Abb. 11: Gruppe B-PBL/TEM: Pfortaderastligatur (PBL) an Tag 0, Therapie mit Temsirolimus ab Tag 5.
RHK = Rückenhautkammer, TU Imp = Tumorimplantation, IVM = Intravitalmikroskopie.

4.12. Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen

Die Auswertung der während der IVM auf DVD aufgezeichneten Aufnahmen erfolgte offline am Computer mit einem speziell entwickelten Programm (CAPIMAGE, Zeintl Software Engineering, Heidelberg, Deutschland). Hierfür war der Computer mit einem DVD-Recorder (Panasonic LQ-MD800E, Osaka, Japan) und einem Bildschirm verbunden.

4.12.1. Tumorgröße/-wachstum

Die Bestimmung des Parameters Tumorwachstum erfolgte über die Messung der Größenzunahme der Tumorfläche pro IVM-Aufnahme. Hierfür wurde in den Aufnahmen der 4-fachen Vergrößerung durch Umfahren des Tumorrands die Tumorfläche in mm^2 berechnet. Es wurde die Programmeinstellung „Area Border“ benutzt.

4.12.2. Kapillardichte

Die Erfassung der Kapillardichte des Tumors erfolgte anhand der Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung. Es wurden vier Felder des Tumorrandes (A-D) und vier Felder des Tumorzentrums (E-H) ausgewertet (siehe Abbildung 2 unter 4.8.).

In der Programmeinstellung „Dens LA“ wurden alle im Tumor neu gebildeten Gefäße mit dem Cursor nachgefahren. Daraus wurde die Gesamtlänge der perfundierten Kapillarabschnitte pro Feld in cm/cm^2 berechnet.

4.12.3. Kapillardurchmesser

Der Parameter Kapillardurchmesser wurde in den Aufzeichnungen der 20-fachen Vergrößerung ausgewertet. Es wurden wiederum die Felder A-D des Tumorrandes sowie die Felder E-H im Tumorzentrum begutachtet.

In der Einstellung „DiaMa“ wurde von jeweils 5 für diesen Tumorausschnitt repräsentativen Kapillaren der Querschnitt in μm gemessen. Anschließend wurde der Mittelwert dieser Gefäßdurchmesser bestimmt.

4.12.4. Neoangiogenese-Score

Der im Kapitel 5.2.3. und 5.3.3. relevante Neoangiogenese-Score ist ein Bewertungssystem, bei dem für die Gefäßneubildung in den einzelnen Beobachtungsfeldern Punkte zwischen 0 und 8 vergeben werden. 0 Punkte bedeutet in keinem der 8 Beobachtungsfelder sind neu gebildete Gefäße nachweisbar. Bei 8 Punkten liegt in allen Beobachtungsfeldern Neoangiogenese vor.

4.13. Histologie und Immunhistochemie

4.13.1. Erstellung der Schnitte

Die nach Versuchsende in 4%iges Formalin eingelegten Hälften des entnommenen Tumors wurden nach 48 Stunden der Formalinlösung (Roti-Histofix 4%®, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) entnommen und zunächst für zwei Stunden mit Leitungswasser gespült. Dann folgte eine Entwässerung der Proben in aufsteigenden Alkoholreihen (Carl Roth GmbH & Co. KG). Im Anschluss wurden die Proben drei Mal für 30 min in Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG) gebadet. Dann schloss sich die Einbettung in Paraffin (Granopent® „P“, Paraffin in Plättchen, Carl Roth GmbH & Co. KG) an. Dafür wurden die Proben für ca. 20 min bei -4° C in Sakura Tissue-Tek® (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, USA) heruntergekühlt. Dann konnten mit einem Mikrotom (Leica SM2000R, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) 5µm dünne Schnitte angefertigt und auf Objektträgern (Objektträger, ca. 76x26mm, geputzt/gebrauchsfertig, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) befestigt werden.

4.13.1.1. HE-Färbung

Die Färbung der Schnitte erfolgte im Standardverfahren nach Mayer mit Hämatoxylin und Eosin. Vor Beginn des Vorgangs wurden die Schnitte entparafiniert.

4.13.1.2. PCNA

Zum Nachweis von Proliferation wurden ausgewählte Schnitte mit dem Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) immunhistochemisch in der indirekten Immunoperoxidasetechnik angefärbt. Nach der Entparafinierung wurden die Schnitte zunächst mit 3%igem H₂O₂ und 2%igem Ziegennormalserum inkubiert um endogene Peroxidasen und unspezifische

Bindungsstellen zu blockieren. Ein monoklonaler Maus-anti-pan-PCNA-Antikörper (PC10; 1:50; DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) wurde als primärer Antikörper benutzt. Als sekundärer Antikörper fungierte der Streptavidin-Biotin-Komplex-Peroxidase ein biotinkoppelter Ziegen-anti-Maus-IgG-Antikörper (1:200, LSAB 2 System HRP, Dako Deutschland GmbH). 3,3'-Diaminobenzidin (Dako Deutschland GmbH) wurde als Chromogen verwendet. Die Schnitte wurden mit Hemalaun nach Mayer gegengefärbt.

4.13.1.3. Caspase-3

Gespaltene Caspase-3 dient als Marker für Apoptose. Auch in diesem Färbeverfahren wurde die indirekte Immunoperoxidasetechnik angewendet. Es erfolgte wiederum die Blockierung von endogenen Peroxidasen und unspezifischen Bindungsstellen durch die Inkubation mit 3%igem H_2O_2 und 2%igem Ziegennormalserum. Hier wurde ein polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-cleaved-Caspase-3-Antikörper (Asp175; 1:50; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) als Primärantikörper eingesetzt. Der cleaved Caspase-3-Antikörper weist endogene Bruchstücke nach, jedoch nur kurze Fragmente (17/19 kDa) von aktivierter Caspase-3, nicht das intakte Molekül. Ein biotinylierter Ziegen-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper (1:200, LSAB 2 System HPR, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) wurde als sekundärer Antikörper für die Peroxidasereaktion verwendet. 3,3'-Diaminobenzidin (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) diente als Chromogen. Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalun nach Mayer.

Zur Negativkontrolle wurden weitere Schnitte beider Färbungen mit einem entsprechenden isotypenspezifischen Kontroll-Antikörper (Sigma Aldrich Chemie GmbH) anstelle des primären Antikörpers, gemäß des beschriebenen Protokolls behandelt, um die Spezifität der Antikörper-Bindung nachzuweisen. Sämtliche Kontrollen waren negativ.

4.13.2. Auswertung der Schnitte

Die Auswertung der Schnitte erfolgte semiquantitativ durch Auflichttechnik an einem Olympus BX 60-Lichtmikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland), an welches eine Digitalkamera (Zeiss AxioCam HRc; Carl Zeiss Jena GmbH) angeschlossen war.

4.13.2.1. Tumorinfiltration

Die Infiltration des Tumors in die Muskelschicht wurde anhand der HE-gefärbten Schnitte ausgewertet. Es wurden die Abschnitte der durch die Tumorzellen infiltrierten Muskularisschicht im Verhältnis zur Gesamttumorausdehnung in Prozent ausgewertet.

4.13.2.2. Proliferationsrate

Es wurden jeweils 10 High Power Fields (HPF) pro Schnitt ausgewertet. Dabei wurden die PCNA-positiven Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl pro HPF gesetzt.

4.13.2.3. Apoptoserate

Es wurden jeweils 10 HPF pro Schnitt ausgewertet. Dabei wurden die Caspase-3-positiven Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl pro HPF gesetzt.

4.14. Statistik

Alle statistischen Berechnungen, sowie die Erstellung der Graphen wurden mit den Computerprogrammen Sigma Plot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) und Sigma Stat for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) vorgenommen. Die Daten wurden als

Mittelwert \pm SEM angegeben. Die Gruppen wurden auf Normalverteilung und Homogenität der Varianz verglichen. Zuerst wurde eine one-way Varianzanalyse (ANOVA) und dann ein passender post-hoc-Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

Die TEM-Gruppe wurde nicht mit der PBL-Gruppe verglichen und die CON-Gruppe wurde nicht mit der PBL/TEM-Gruppe verglichen.

5. Ergebnisse

Im Allgemeinen zeigten sich die Mäuse von der Rückenhautkammerpräparation, der Laparatomie, der Pfortaderastligatur und der Tumorzellimplantation nicht beeinträchtigt. Die Tiere erholten sich nach der Operation gut und tolerierten die mehrfachen Intravitalmikroskopien während der 14 Tage dauernden Versuche problemlos.

5.1. Anzahl, Gewicht und Überleben der Versuchstiere

Insgesamt gingen 58 Tiere in die Auswertungen ein. Das durchschnittliche Gewicht der Tiere betrug an Tag -2 20 g - 22 g. Das Nassebergewicht lag zwischen 0,7 und 1,2 g. Bezüglich des Nassebergewichts ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

Während der Versuchsdurchführung verstarben 4 Tiere aufgrund von Operationskomplikationen während der Operation. 6 Mäuse mussten wegen Kammerinfektion eingeschläfert werden.

5.2. Wirkung von Temsirolimus auf das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen disseminierten Tumorzellen und Mikrometastasen während Pfortaderastligatur (Versuchsteil

A)

5.2.1. Tumorwachstum

In der sham-operierten Kontrollgruppe (A-CON) zeigte sich während des gesamten Beobachtungszeitraums von 14 Tagen eine kontinuierliche Zunahme der Tumorfläche.

Durch die tägliche Gabe von Temsirolimus (A-TEM) kam es zu einer signifikanten Reduktion der Tumorfläche an Tag 14 (Abbildung 13 A).

Die Durchführung der Pfortaderastligatur (A-PBL) beeinflusste das Verhalten des Tumorwachstums verglichen mit der sham-operierten Kontrollgruppe (A-CON) nicht.

Durch die tägliche Gabe von Temsirolimus (A-PBL/TEM) zeigte sich eine signifikante Abnahme der Tumorfläche ab Tag 11 nach PBL im Vergleich mit der PBL-Kontrollgruppe (A-PBL), (Abbildung 13 B).

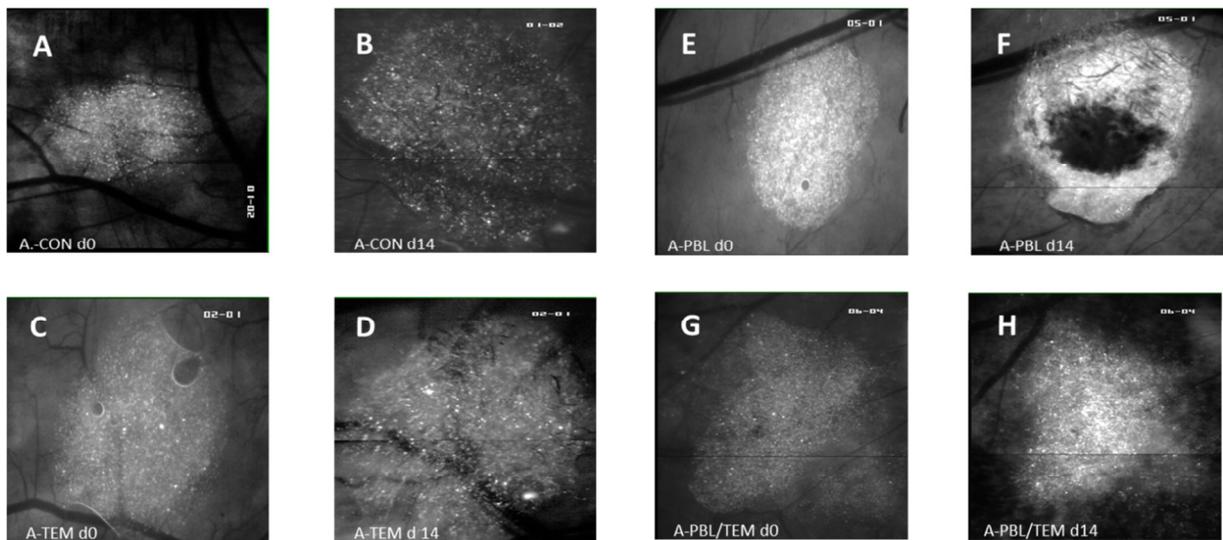


Abb. 12: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Tumorfläche jeweils an d 0 und d 14 in 4facher Vergrößerung. Die Abbildungen an d 14 sind aufgrund der Größe der Tumoren zum Teil aus mehreren Einzelaufnahmen zusammengesetzt.

A, B: Gruppe A-CON; **C, D:** Gruppe A-TEM; **E, F:** Gruppe A-PBL; **G, H:** Gruppe A-PBL/TEM.

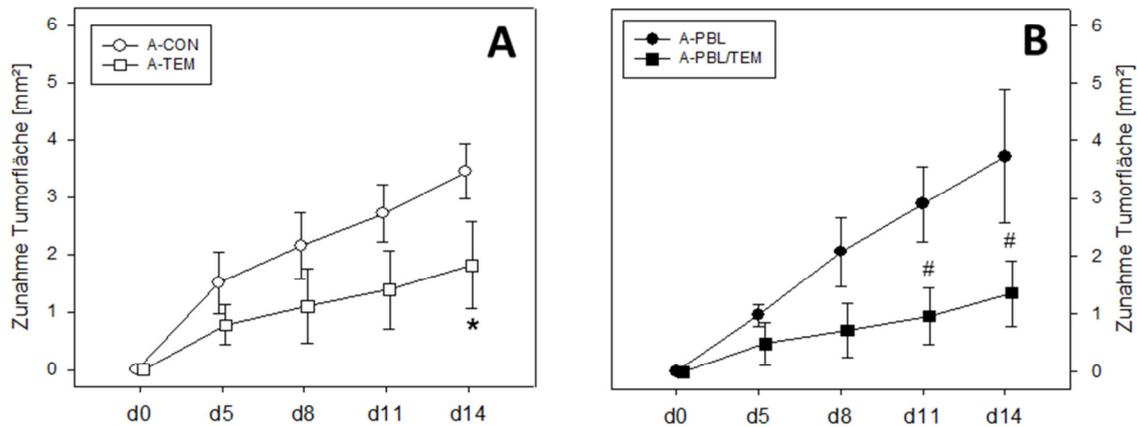


Abb.13: Darstellung der Flächenzunahme der Mikrometastasen in mm² von Tag 0-14.

A: Laparotomisierte Gruppen: A-CON (weiße Kreise) vs. A-TEM (weiße Quadrate).

B: PBL-Gruppen: A-PBL (schwarze Kreise) vs. A-PBL/TEM (schwarze Quadrate).

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0.05$ vs. A-CON, # $p < 0,05$ vs. A-PBL.

5.2.2. Tumorangiogenese

5.2.2.1. Angiogenese - Tumorrand

In der laparotomierten Kontrollgruppe (A-CON) und in der Pfortaderastligatur-Kontrollgruppe (A-PBL) konnten im Randbereich des Tumors jeweils ab Tag 5 neu gebildete Gefäße nachgewiesen werden. Bis Tag 14 nahm die Neoangiogenese in beiden Gruppen stetig zu (Abbildung 15).

Durch die Therapie mit Temsirolimus konnte die Gefäßneubildung in beiden Gruppen (A-TEM und A-PBL/TEM) ab Tag 11 signifikant verringert werden (Abbildung 15).

Die Pfortaderastligatur verglichen mit der Laparatomie beeinflusste die Neoangiogenese nicht signifikant.

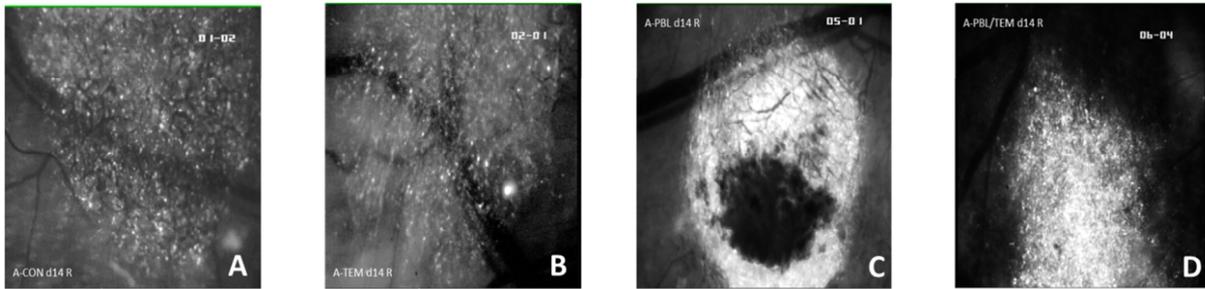


Abb. 14: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Gefäßdichte im Tumorrand jeweils an d 14.

A: Gruppe A-CON, **B:** Gruppe A-TEM, **C:** Gruppe A-PBL, **D:** A-PBL/TEM.

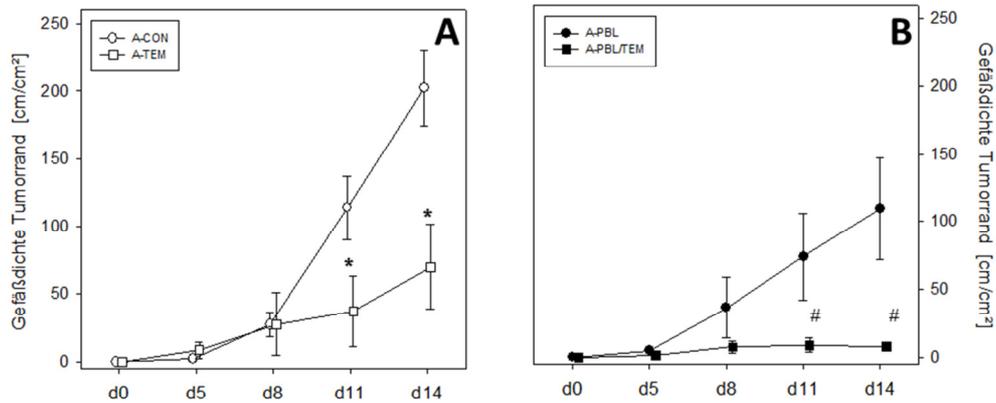


Abb. 15: Dargestellt ist die Gefäßdichte im Tumorrand der Mikrometastasen in cm/cm^2 Tag 0 -14.

A: Sham-operierte Gruppen: A-CON (weiße Kreise) vs. A-TEM (weiße Quadrate).

B: PBL-Gruppen: A-PBL (schwarze Kreise) vs. A-PBL/TEM (schwarze Quadrate).

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0.05$ vs. A-CON, # $p < 0,05$ vs. A-PBL.

5.2.2.2. Angiogenese - Tumorzentrum

Im Zentrum der Tumoren begann sowohl in der sham-operierten Kontrollgruppe (A-CON) als auch in der Pfortaderastligatur-Kontrollgruppe (A-PBL) ab Tag 5 die Gefäßneubildung.

Die Neoangiogenese nahm bis zu Versuchsende stets zu (Abbildung 17).

In beiden Gruppen (A-TEM und A-PBL/TEM) zeigte sich eine signifikante Reduktion der Gefäßdichte durch die tägliche Gabe von Temsirolimus im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen.

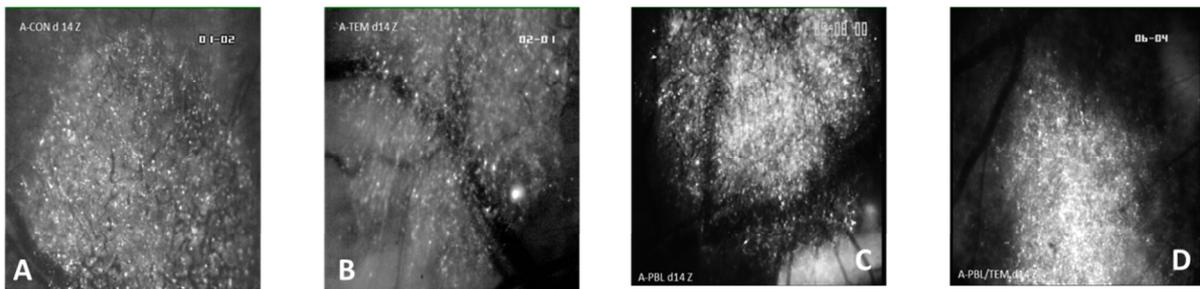


Abb. 16: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Gefäßdichte im Tumorzentrum jeweils an d 14.

A: Gruppe A-CON, **B:** Gruppe A-TEM, **C:** Gruppe A-PBL, **D:** A-PBL/TEM.

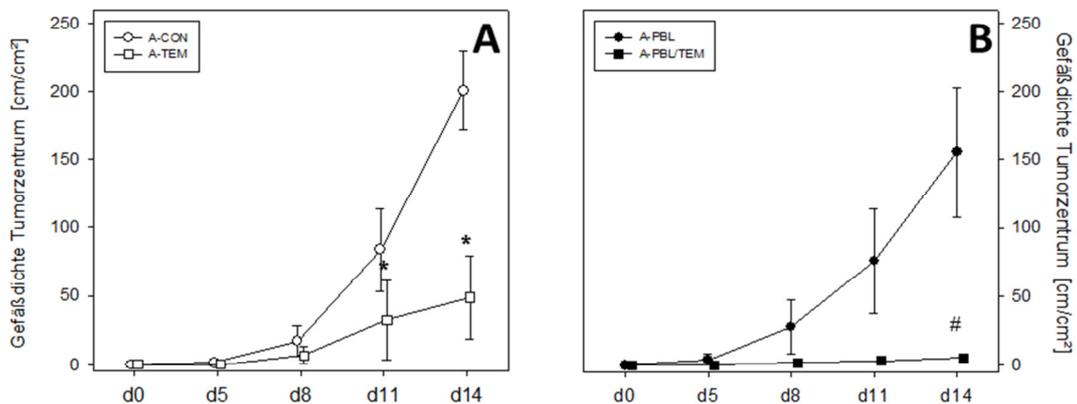


Abb. 17: Darstellung der Gefäßdichte im Zentrum der Mikrometastasen in cm/cm^2 Tag 0 -14.

A: Sham-operierte Gruppen: A-CON (weiße Kreise) vs. A-TEM (weiße Quadrate).

B: PBL-Gruppen: A-PBL (schwarze Kreise) vs. A-PBL/TEM (schwarze Quadrate).

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0.05$ vs. A-CON, # $p < 0.05$ vs. A-PBL.

5.2.3. Neoangiogenese-Score

In der Laparatomie-Kontrollgruppe (A-CON) sowie in der Pfortaderastligatur-Kontrollgruppe (A-PBL) zeigt sich ab Tag 5 bis 14 eine kontinuierliche Zunahme der Gefäßneubildung.

Durch die Gabe von Temsirolimus konnte die Neoangiogenese in beiden Gruppen (A-TEM und A-PBL/TEM) signifikant reduziert werden (Abbildung 19).

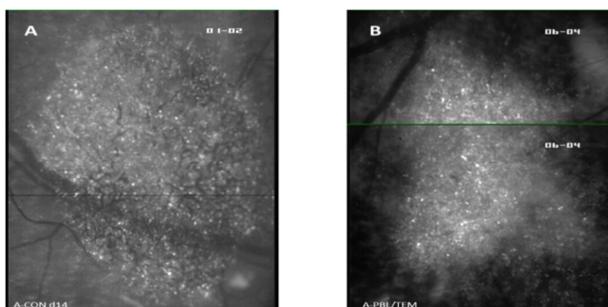


Abb. 18: Gegenüberstellung invitalmikroskopischer Aufnahmen repräsentativer Tumoren an d 14 der Gruppen A-CON (A) und A-PBL/TEM (B).

Die Abbildungen an d 14 sind aufgrund der Tumorgöße aus mehreren Einzelaufnahmen zusammengefügt.

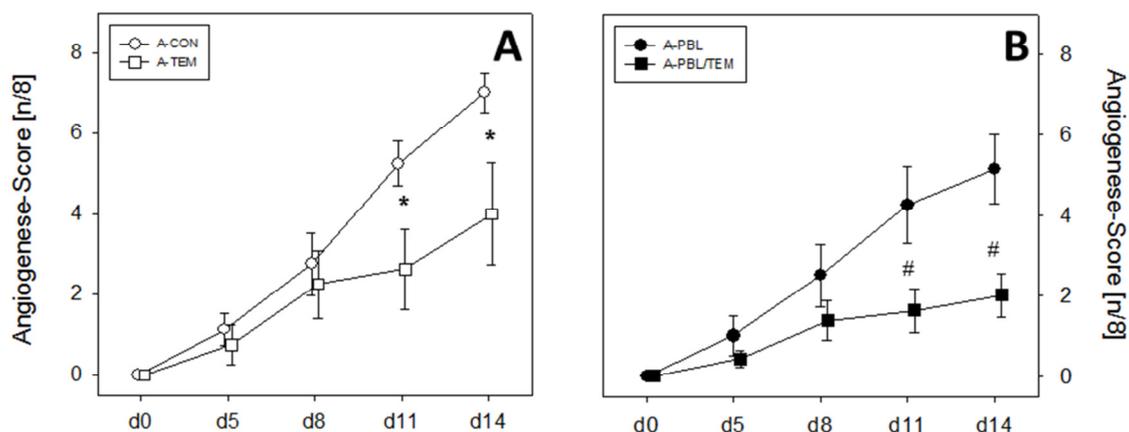


Abb. 19: Darstellung des Neoangiogenese-Scores der Mikrometastasen Tag 0-14.

A: Sham-operierte Gruppen: A-CON (weiße Kreise) vs. A-TEM (weiße Quadrate).

B: PBL-Gruppen: A-PBL (schwarze Kreise) vs. A-PBL/TEM (schwarze Quadrate).

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0.05$ vs. A-CON, # $p < 0,05$ vs. A-PBL.

5.2.4. Tumorzellinfiltration

Die Tumorzellinfiltration in das benachbarte Muskelgewebe lag in der Laparatomie-Kontrollgruppe (A-CON) an Tag 14 bei ca. 55%. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der mit Temsirolimus behandelten Kontrollgruppe (A-TEM), (Abbildung 21 A).

Die Pfortaderastligatur (A-PBL), verglichen mit der Laparatomie (A-CON), beeinflusste die Tumorzellinfiltration ins Nachbargewebe nicht signifikant.

Durch die Gabe von Temsirolimus ab dem Tag der Pfortaderastligatur (A-PBL/TEM) kam es zu einer nicht signifikanten Reduktion der Tumorzellinfiltration im Vergleich mit der Kontrollgruppe (A-PBL), (Abbildung von 21 B).

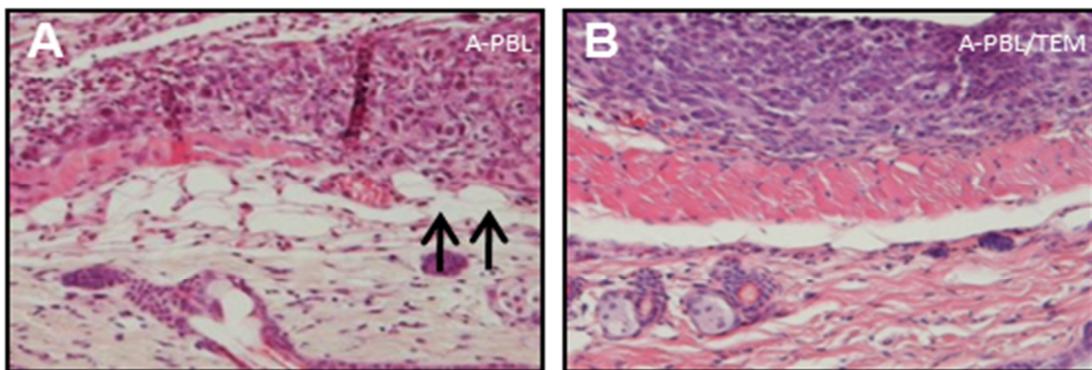


Abb. 20: Schnittbilder der Tumore mit angrenzender Muskularis an d 14, HE-Färbung.

A: Gruppe A-PBL: mit sichtbarer Infiltration des Tumors in die angrenzende Muskelschicht (Pfeile).

B: Gruppe A-PBL/TEM.

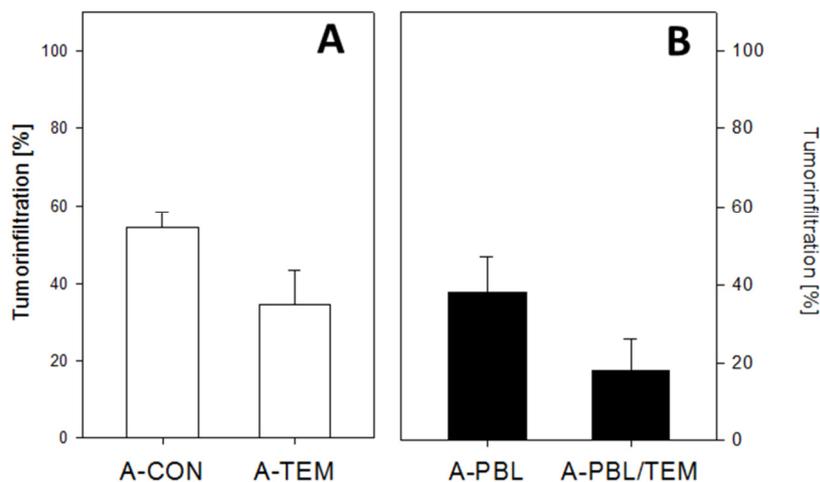


Abb. 21: Darstellung des prozentualen Anteils der infiltrierten Tumorbasis an Tag 14.

A: Sham-operierte Gruppen: A-CON vs. A-TEM.

B: PBL-Gruppen: A-PBL vs. A-PBL/TEM.

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

5.2.5. Tumorzellproliferation

In der sham-operierten Kontrollgruppe (A-CON) zeigten sich an Tag 14 ca. 50 % PCNA positive Zellen.

Durch die Behandlung mit Temsirolimus waren in der Gruppe A-TEM mit $16,9 \pm 5,0\%$ weniger PCNA positive Zellen nachweisbar. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Abbildung 23 A).

Bezüglich der Proliferation zeigte sich in der Pfortaderastligatur-Kontrollgruppe (A-PBL) im Vergleich zur Laparatomie-Kontrollgruppe (A-CON) kein signifikanter Unterschied.

Die tägliche Gabe von Temsirolimus während Pfortaderastligatur hatte einen geringen, aber nicht signifikanten Einfluss auf die Proliferation (A-PBL/TEM) (Abbildung 23 B).

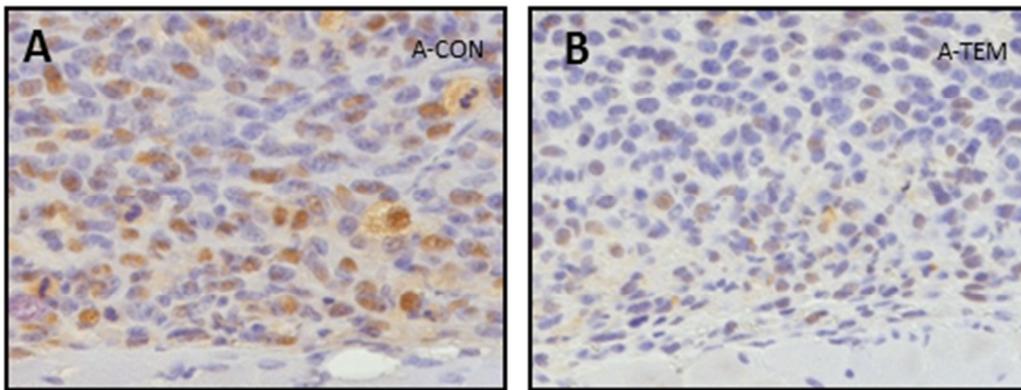


Abb. 22: Gegenüberstellung der Zellproliferation der Gruppen A-CON (A) und A-TEM (B) an d14 anhand von PCNA gefärbten Schnitten; in A zeigen sich signifikant mehr proliferierende Tumorzellen(braun) als in B.

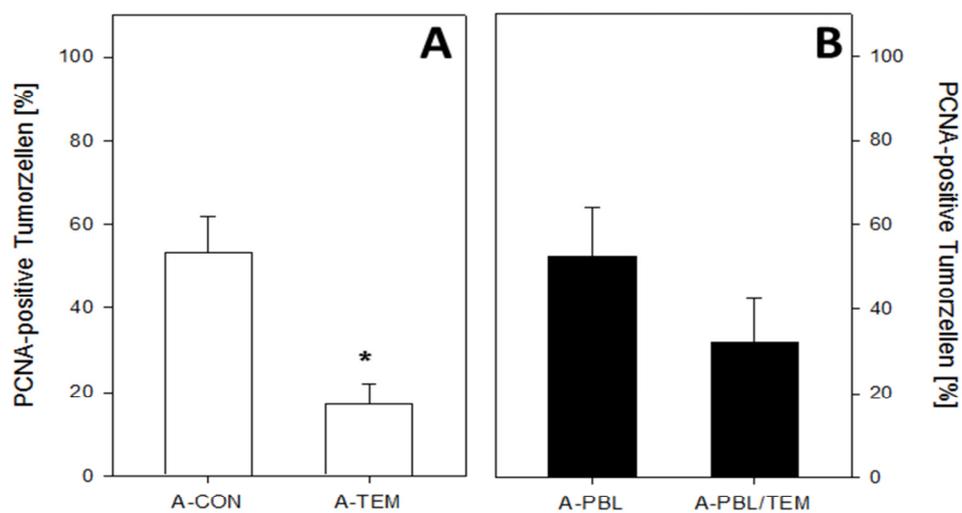


Abb. 23: Anteil der proliferierenden Zellen der Mikrometastasen in % an Tag 14.

A: Sham-operierte Gruppen: A-CON vs. A-TEM.

B: PBL-Gruppen: A-PBL vs. A-PBL/TEM.

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0.05$ vs. A-CON.

5.2.6. Tumorzellapoptose

Weder die Behandlung mit Temsirolimus noch die Pfortaderastligatur hatten Einfluss auf die Expression von Caspase-3 und somit auf die Apoptose-Rate der disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen.

5.3. Wirkung von Temsirolimus auf etablierte extrahepatische kolorektale Metastasen während Pfortaderastligatur (Versuchsteil B)

5.3.1. Tumorwachstum

In der sham-operierten Kontrollgruppe (B-CON) zeigte sich über den gesamten Versuchszeitraum eine stetige Größenzunahme der Tumorfläche (Abbildung 25 A).

Durch die Applikation von Temsirolimus (B-TEM) ergab sich ab Tag 11 eine erkennbare, aber nicht signifikante Tumorgrößenreduktion der bereits etablierten Metastasen (Abbildung 25 A).

Die Pfortaderastligatur (B-PBL) beeinflusste, verglichen mit der sham-operierten Kontrollgruppe (B-CON), das Tumorgrößenwachstum nicht signifikant.

Die Gabe von Temsirolimus nach Pfortaderastligatur (B-PBL/TEM) konnte die Tumorgröße der angewachsenen Metastasen, verglichen mit der Kontrollgruppe (B-PBL), zwischen Tag 11 und 14 geringfügig aber nicht signifikant reduzieren. (Abbildung 25 B)

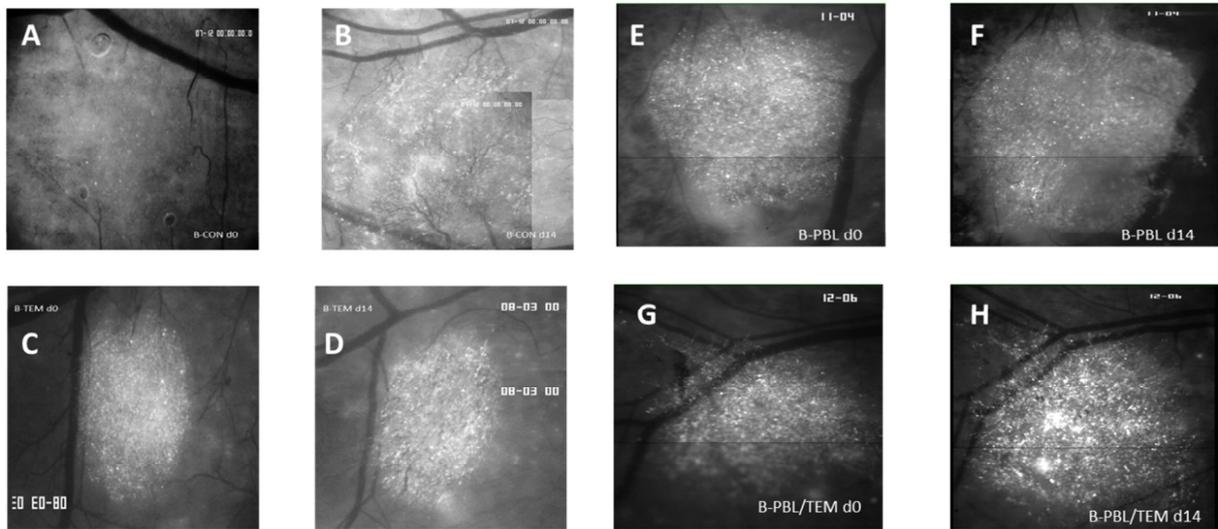


Abb. 24: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Tumorrofläche jeweils an d 0 und d 14 in 4facher Vergrößerung.

Die Abbildungen an d 14 sind aufgrund der Tumorgöße zum Teil aus mehreren Einzelaufnahmen zusammengesetzt.

A, B: Gruppe B-CON; **C, D:** Gruppe B-TEM; **E, F:** Gruppe B-PBL; **G, H:** Gruppe B-PBL/TEM.

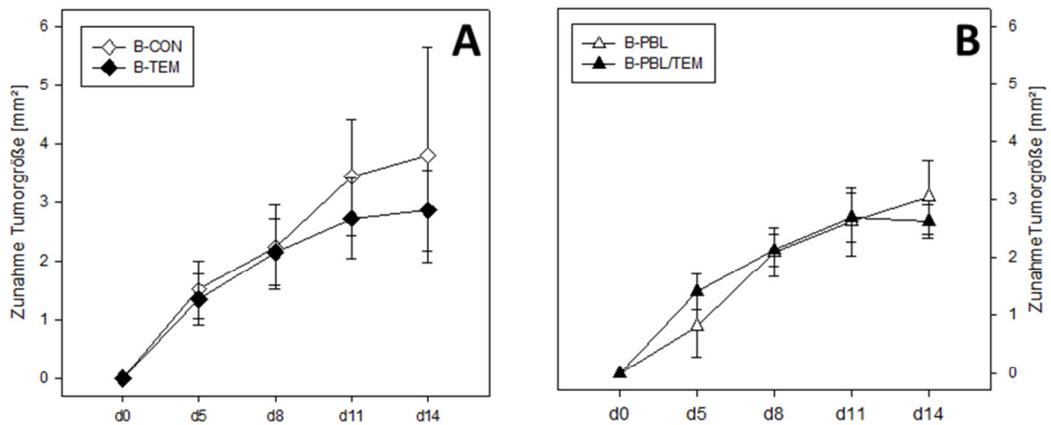


Abb. 25: Darstellung Flächenzunahme der etablierten Metastasen in mm² von Tag 0-14.

A: Sham-operierte Gruppen: B-CON (weiße Vierecke) vs. B-TEM (schwarze Vierecke).

B: PBL-Gruppen: B-PBL (weiße Dreiecke) vs. B-PBL/TEM (schwarze Dreiecke).

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

5.3.2. Tumorangiogenese

5.3.2.1. Angiogenese - Tumorrand

In der sham-operierten Kontrollgruppe (B-CON) zeigte sich im Tumorrand der etablierten Metastasen ab Tag 5 eine kontinuierlich zunehmende Gefäßneubildung.

Durch die Therapie mit Temsirolimus (B-TEM) ergab sich eine signifikante Reduktion der Gefäßdichte an Tag 14 (Abbildung 27 A).

Während der Pfortaderastligatur (B-PBL) war die Gefäßdichte im Tumorrand der bereits etablierten Metastasen im Vergleich zur sham-operierten Kontrollgruppe (B-CON) deutlich erkennbar, aber nicht signifikant reduziert.

Die Behandlung der etablierten Metastasen mit Temsirolimus nach Pfortaderastligatur (B-PBL/TEM) führte zu einer signifikanten Verminderung der Gefäßdichte im Tumorrand an Tag 14 (Abbildung 27 B).

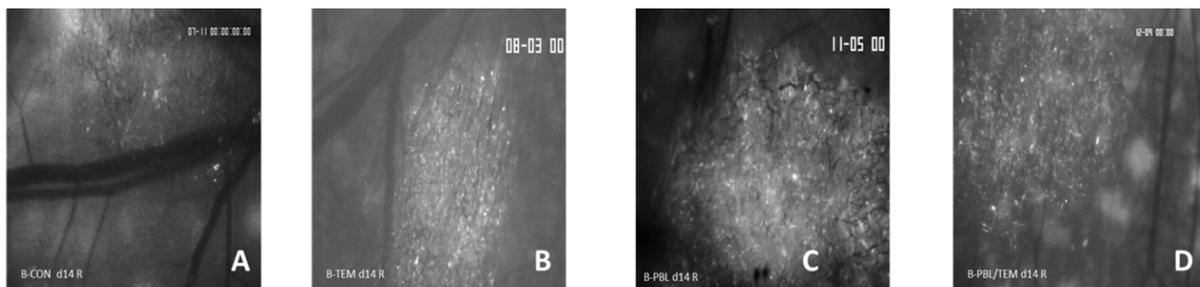


Abb. 26: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Gefäßdichte im Tumorrand jeweils an d 14.

A: Gruppe B-CON, **B:** Gruppe B-TEM, **C:** Gruppe B-PBL, **D:** B-PBL/TEM.

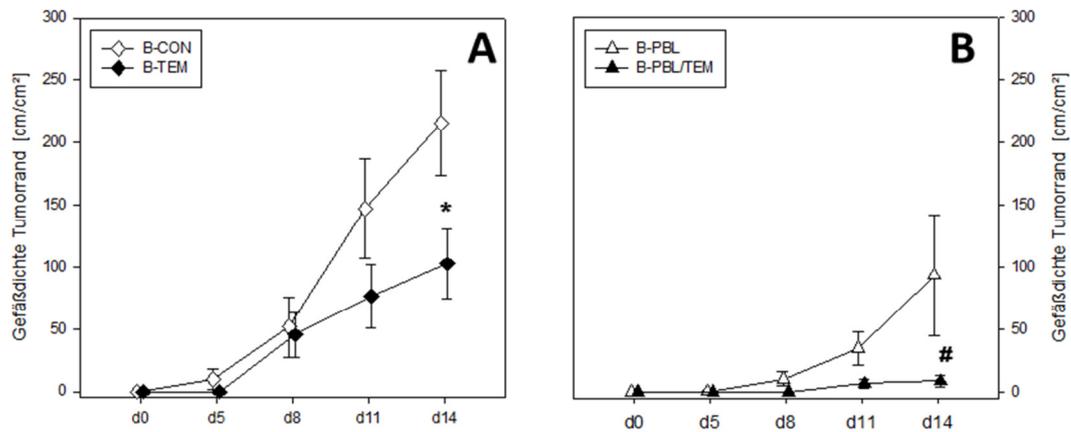


Abb. 27: Darstellung der Gefäßdichte im Tumorrand der etablierten Metastasen in cm/cm² Tag 0 -14.

A: Sham-operierte Gruppen: B-CON (weiße Vierecke) vs. B-TEM (schwarze Vierecke).

B: PBL-Gruppen: B-PBL (weiße Dreiecke) vs. B-PBL/TEM (schwarze Dreiecke).

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0.05$ vs. B-CON, # $p < 0,05$ vs. B-PBL

5.3.2.2. Angiogenese - Tumorzentrum

Im Tumorzentrum der sham-operierten Kontrollgruppe (B-CON) nahm die Gefäßneubildung von Tag 5 bis 14 stetig zu.

Die Applikation von Temsirolimus (B-TEM) führte zu einer sichtbaren, aber nicht signifikanten Abnahme der Gefäßdichte im Zentrum der etablierten Metastasen (Abbildung 29 A).

Die Pfortaderastligatur (B-PBL) hatte verglichen mit der sham-operierten Kontrollgruppe (B-CON) keinen signifikanten Einfluss auf die Neoangiogenese.

Durch die Gabe von Temsirolimus während Pfortaderastligatur (B-PBL/TEM) kam es an Tag 14 zu einer signifikant verringerten Gefäßdichte (Abbildung 29 B).

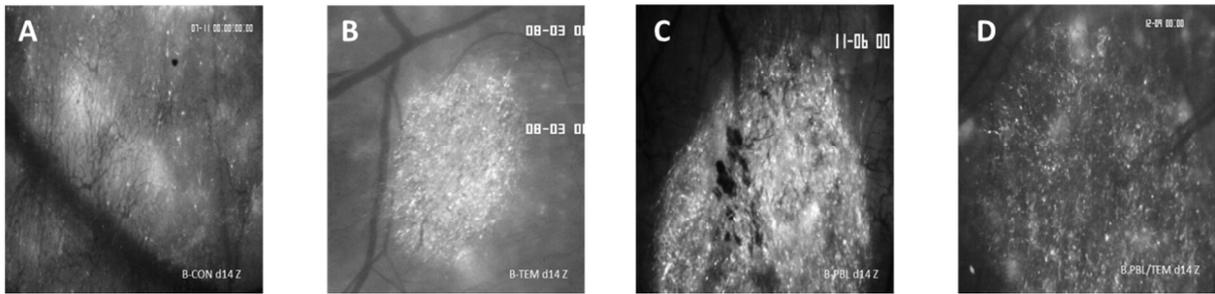


Abb. 28: Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Gefäßdichte im Tumorzentrum jeweils an d 14.

A: Gruppe B-CON, **B:** Gruppe B-TEM, **C:** Gruppe B-PBL, **D:** B-PBL/TEM.

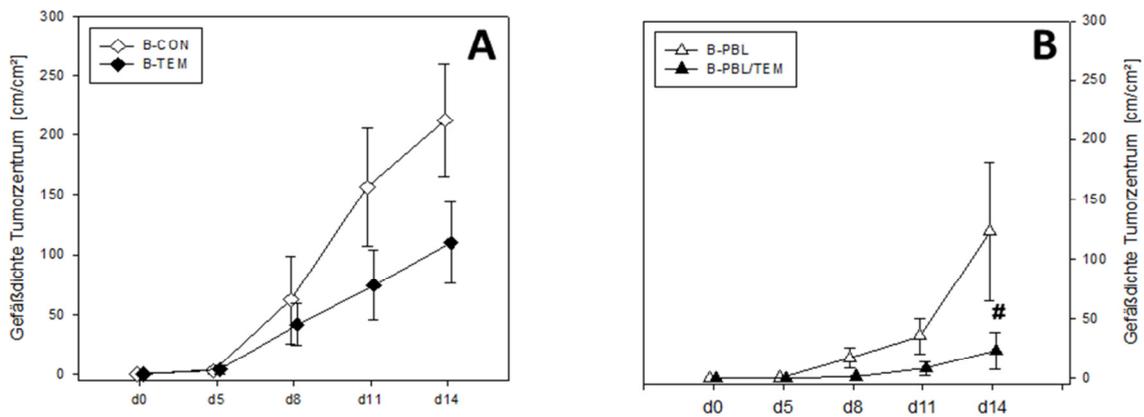


Abb. 29: Darstellung der Gefäßdichte im Tumorzentrum der etablierten Metastasen in cm/cm² Tag 0 -14.

A: Sham-operierte Gruppen: B-CON (weiße Vierecke) vs. B-TEM (schwarze Vierecke).

B: PBL-Gruppen: B-PBL (weiße Dreiecke) vs. B-PBL/TEM (schwarze Dreiecke).

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. #p < 0.05 vs. B-PBL.

5.3.3. Neoangiogenese-Score

In der sham-operierten Kontrollgruppe der bereits etablierten Metastasen (B-CON) zeigte sich ein kontinuierlich ansteigender Neoangiogenese-Score.

Durch die Behandlung mit Temozolomid (B-TEM) kam es ab Tag 8 zu einem Stagnieren des Wertes. Dies blieb jedoch ohne Signifikanz (Abbildung 31 A).

Die Pfortaderastligatur (B-PBL) führte zu einer nicht signifikanten Reduktion des Neoangiogenese-Scores verglichen mit der sham-operierten Kontrollgruppe (B-CON).

Die Gabe von Temsirolimus während Pfortaderastligatur (B-PBL/TEM) verringerte den Neoangiogenese-Score im Vergleich PBL-Kontrollgruppe (B-PBL) nicht signifikant (Abbildung 31 B).

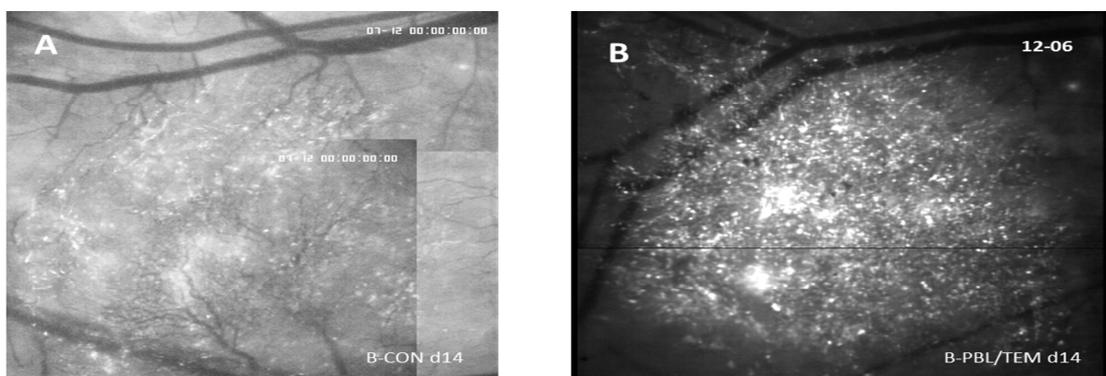


Abb. 30: Gegenüberstellung invitalmikroskopischer Aufnahmen repräsentativer Tumoren an d 14 der Gruppen B-CON (A) und B-PBL/TEM (B).

Die Abbildungen an d 14 sind aufgrund der Tumorgröße aus mehreren Einzelaufnahmen zusammengesetzt.

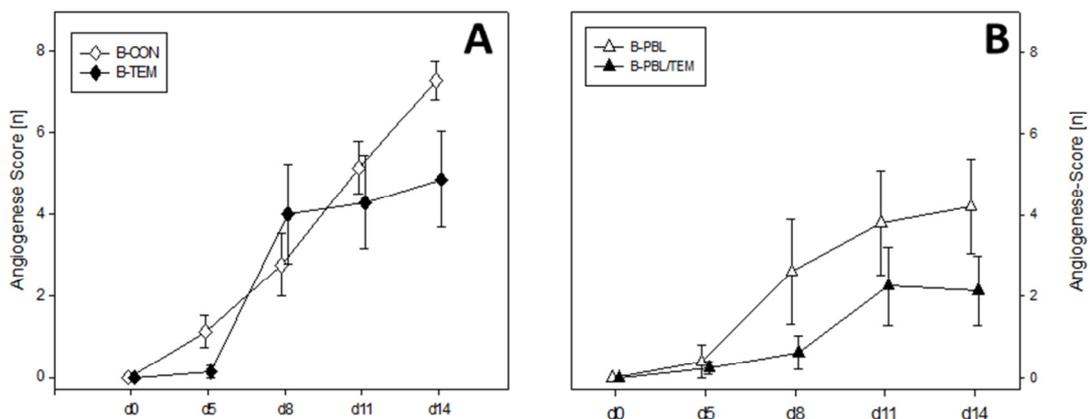


Abb. 31: Darstellung des Neoangiogenese-Scores der Mikrometastasen Tag 0-14.

A: Sham-operierte Gruppen: B-CON (weiße Quadrate) vs. B-TEM (schwarze Quadrate).

B: PBL-Gruppen: B-PBL (weiße Dreiecke) vs. B-PBL/TEM (schwarze Dreiecke).

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

5.3.4. Tumorerinfiltration

In der sham-operierten Kontrollgruppe der etablierten Metastasen (B-CON) ergab sich an Tag 14 eine Tumorerinfiltration in das benachbarte Muskelgewebe von ca. 65%.

Durch die tägliche Gabe von Temsirolimus (B-TEM) kam es zu keiner signifikanten Reduktion der Infiltration ins Nachbargewebe (Abbildung 33 A).

Die Pfortaderastligatur (B-PBL) beeinflusste das Infiltrationsverhalten der etablierten Metastasen verglichen mit der sham-operierten Kontrollgruppe (B-CON) nicht signifikant.

Durch die Applikation von Temsirolimus während Pfortaderastligatur (B-PBL/TEM) konnte im Vergleich mit der PBL-Kontrollgruppe (B-PBL) die Tumorerinfiltration ins benachbarte Gewebe nicht signifikant reduziert werden (Abbildung 33 B).

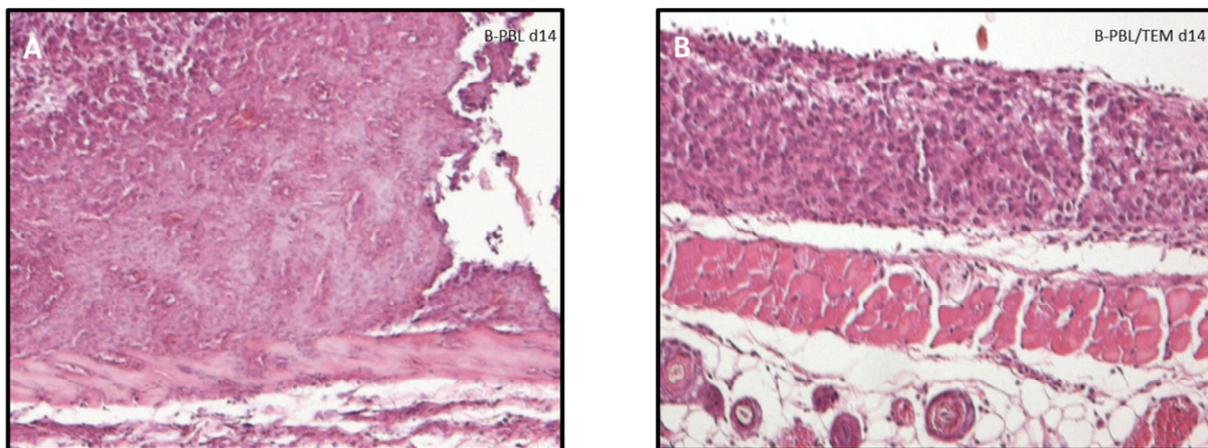


Abb. 32: Schnittbilder der Tumore mit angrenzender Muskularis an d 14, HE-Färbung.

A: Gruppe B-PBL: mit sichtbarer Infiltration des Tumors in die angrenzende Muskelschicht.

B: Gruppe B-PBL/TEM.

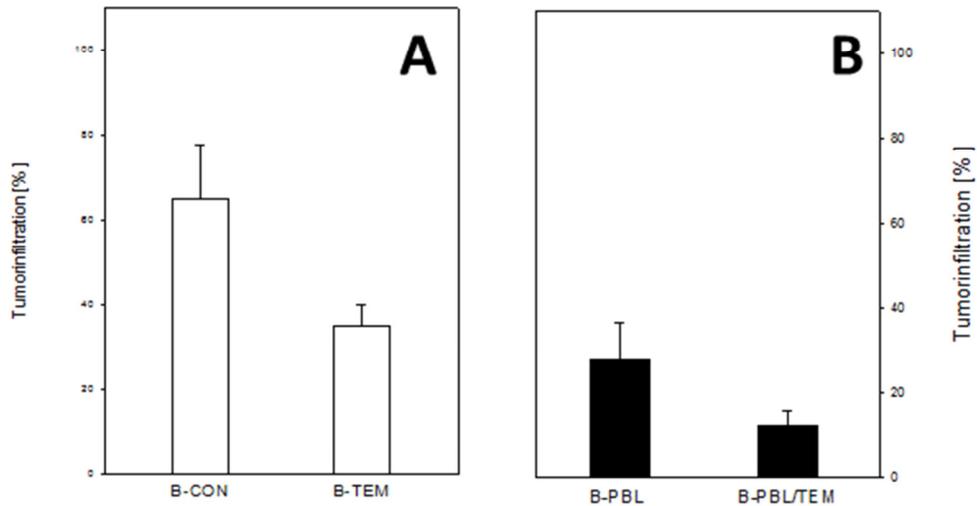


Abb. 33: Infiltration der etablierten Metastasen in % in das benachbarte Muskelgewebe an Tag 14.

A: Sham-operierte Gruppen: B-CON vs. B-TEM.

B: PBL-Gruppen: B-PBL vs. B-PBL/TEM.

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

5.3.5. Tumorzellproliferation

In der sham-operierten Kontrollgruppe (B-CON) zeigten sich an Tag 14 ca. 30 % PCNA positive Zellen.

Die Therapie mit Temsirolimus (B-TEM) hatte keinen Einfluss auf die Proliferation der etablierten Metastasen (Abbildung 34 A).

Durch die Pfortaderastligatur (B-PBL) kam es im Vergleich mit der sham-operierten Kontrollgruppe (B-CON) zu keinem signifikanten Anstieg bezüglich der Zellproliferation.

Die Temsirolimus-Gabe während Pfortaderastligatur (B-PBL/TEM) führte verglichen mit der Kontrollgruppe zu keiner signifikanten Reduktion der PCNA-positiven Zellen innerhalb der etablierten Metastasen (Abbildung 34 B).

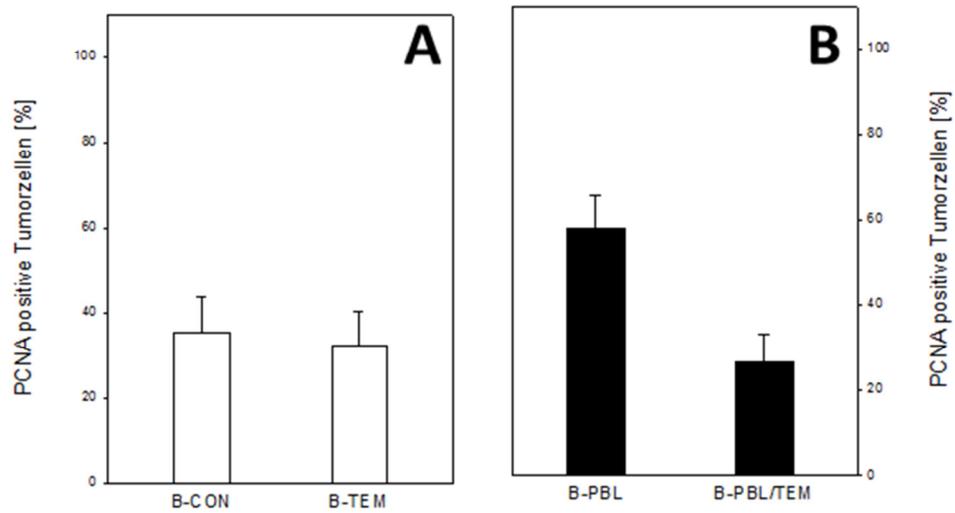


Abb. 34: Proliferierende Zellen der etablierten Metastasen in % an Tag 14.

A: Sham-operierte Gruppen: B-CON vs. B-TEM.

B: PBL-Gruppen: B-PBL vs. B-PBL/TEM.

Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben.

5.3.6. Tumorzellapoptose

Weder die Behandlung mit Temsirolimus noch die Pfortaderastligatur hatten Einfluss auf die Expression von Caspase-3 und somit auf die Apoptose-Rate der etablierten Metastasen.

6. Diskussion

6.1. Diskussion der Methoden

6.1.1. Rückenhautkammer

Das Modell der Rückenhautkammer ist ein gut etabliertes und weit verbreitetes Verfahren zur Beobachtung von Mikrozirkulation, Angiogenese und Tumorwachstum in vivo. Per Intravitalmikroskopie kann über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen die Mikrozirkulation und das Anwachsen von implantierten (Tumor-)Zellen unter physiologischen Bedingungen wiederholt untersucht werden. Zur Erlangung dieser physiologischen Bedingungen wird in einem natürlich vorkommenden Gewebe, wie der Rückenhaut von Maus, Hamster oder Ratte, eine transparente Kammer eingesetzt und (Tumor-)Zellen implantiert [100]. Weder durch die Kammerimplantation noch durch das implantierte Gewebe kommt es zu einer Beeinträchtigung des Gefäßsystems der Rückenhaut. Wird eine Erholungsphase von 2-3 Tagen nach der Kammerpräparation eingehalten, kann das verursachte Gewebetrauma in den folgenden Untersuchungen vernachlässigt werden. Die Rückenhautkammer besteht aus einem Titanrahmen, der die Belastung der Tiere aufgrund des geringen Gewichts, der guten Stabilität und der Biokompatibilität gering hält [89].

Ein Nachteil der Rückenhautkammer ist das relativ kleine Beobachtungsfeld (Durchmesser 11mm), so dass die Zahl der zu implantierenden Zellen eingeschränkt ist. Deshalb wurden in den hier dargestellten Versuchen nicht mehr als $2\mu\text{l}$ ($= 1 \times 10^5$) Tumorzellen implantiert.

Ein spezifischer Nachteil der Rückenhautkammer der Maus ist die komplexere Präparation der Gewebeschichten im Vergleich zum Hamster [100]. In dieser Studie wurde sich aufgrund der guten genetischen Charakterisierung der Maus trotzdem für diese Spezies entschieden. So ist es z. B. möglich eine Vielzahl von Antikörpern für immunhistochemische Analysen einzusetzen [101].

Zudem muss erwähnt werden, dass die Implantation von Tumorzellen in die Rückenhaut der Maus nicht dem Mechanismus der Absiedlung von extrahepatischen Metastasen im menschlichen Körper entspricht. Nichts desto trotz ist das Modell der Rückenhautkammer sehr gut für das Studium der Tumorangiogenese und des Metastasenwachstums verwendbar und wurde dafür schon in diversen Studien eingesetzt [50, 81, 83, 88, 123, 136].

6.1.2. Pfortaderastligatur

Die Pfortaderastligatur (PBL) ist ein seit über 20 Jahren im klinischen Alltag gebräuchliches präoperatives Verfahren [46], das bei Patienten mit initial inoperablen kolorektalen Lebermetastasen zur Anwendung kommt. Durch die PBL wird in dem zukünftigem Restlebergewebe eine Parenchymhypertrophie von durchschnittlich 12 % herbeigeführt [7, 116] und so die anschließende ausgedehnte Leberresektion überhaupt erst möglich [16, 75, 96]. Analog zur allgemeinen chirurgischen Methodik wurde in der vorliegenden Arbeit die PBL an der Maus durchgeführt, um so die klinische Praxis zu simulieren.

Bewusst ist auf die Implantation von kolorektalen Tumorzellen in den links lateralen Leberlappen vor PBL zur Simulation von intrahepatischen kolorektalen Metastasen verzichtet worden. Im Fokus dieser Studie standen extrahepatische Proliferationsvorgänge von disseminierten Tumorzellen/Mikrometastasen und bereits etablierten Metastasen. Das Verhalten von intrahepatischen Metastasen während PBL wurde bereits mehrfach in vorangegangenen Studien untersucht [18, 37, 77, 79] und war für die Fragestellung der aktuellen Arbeit von untergeordneter Bedeutung.

6.2. Diskussion der Ergebnisse

6.2.1. Einfluss der Pfortaderastligatur auf das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen disseminierten Tumorzellen und Mikrometastasen (Versuchsteil A)

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Verfahren der PBL keinen proliferationsfördernden Einfluss auf extrahepatische kolorektale disseminierte Tumorzellen und Mikrometastasen (DTC und MM) zu haben scheint.

Dies ergab sich in der Gegenüberstellung der Ergebnisse der sham-operierten Kontrollgruppe (A-CON) mit der PBL-Kontrollgruppe (A-PBL). Hier zeichnete sich in allen erhobenen Parametern derselbe Trend ab: in beiden Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied bzgl. Tumorgroße, Gefäßdichte in Tumorrand und -zentrum, Muskelinfiltrationstiefe, Proliferationsrate und Nassebergewicht an Tag 14 nachgewiesen [137].

Somit hat das Verfahren der PBL möglicherweise deutlich weniger Einfluss auf das Proliferationsverhalten und die Wachstumsrate von extrahepatischen DTC und MM im Vergleich zu der bereits mehrfach nachgewiesenen Wirkung auf intrahepatische kolorektale DTC und (Mikro-)Metastasen [79, 124].

Die PBL triggert anhand der hervorgerufenen Atrophie im ligierten Leberlappen die Expression von Wachstumsfaktoren (z.B. HGF, VEGF) und führt zur Zellproliferation im zukünftigen Restlebergewebe [79]. Dadurch kommt es zur Steigerung der Wachstumsrate von kolorektalen DTC, MM und bereits etablierten kolorektalen Lebermetastasen (KRLM) innerhalb des gesamten Leberparenchyms und konsekutiv zur Entstehung von neuen und zur Größenzunahme von bereits etablierten KRLM [8, 18, 37, 77, 105, 147].

Ursächlich für die unbeeinflusste Proliferationsrate der extrahepatischen kolorektalen DTC und MM während PBL könnte der Umstand sein, dass es nur lokal innerhalb des

Leberparenchyms, aber nicht systemisch zu einer vermehrten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren während der PBL kommt. Möglicherweise ist der Trigger zur Ausschüttung der Wachstumsfaktoren durch die PBL insgesamt viel geringer als z.B. bei einer ausgedehnten Hepatektomie. Somit könnte die systemisch zu gering wirksame Menge an Wachstumsfaktoren dafür verantwortlich sein, dass die proliferationsfördernde Wirkung extrahepatisch ausbleibt.

Eine weitere Ursache für die extrahepatisch nicht gesteigerte Proliferationsrate der DTC und MM während PBL könnte im Studiendesign der hier vorliegenden Arbeit liegen. Kollmar et al. konnten in experimentellen Studien in Bezug auf intrahepatisches kolorektales Tumorwachstum zeigen, dass dieses erst zwischen Tag 14 und 21 nach PBL stark beschleunigt war [79]. Möglicherweise ist das durch Kollmar et al. aufgezeigte verspätet beschleunigte Tumorwachstum nach PBL ursächlich für die an Tag 14 noch nicht sichtbar erhöhte Proliferationsrate der extrahepatischen kolorektalen DTC und MM. Diese Frage müsste letztlich durch Folgestudien, die über ein längeres Zeitintervall von mindestens 21 Tagen angelegt sind, geklärt werden. Hierfür müsste jedoch ein anderes Studienmodell gewählt werden, da sich die Rückenhautkammer nur bedingt für länger angelegte Studien eignet.

6.2.2. Wirkung von Temeirolimus während Pfortaderastligatur auf das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen disseminierten Tumorzellen und Mikrometastasen (Versuchsteil A)

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass die intrahepatisch wachstumsfördernde Wirkung der PBL sehr wahrscheinlich keinen Einfluss auf den für die Tumorthherapie entscheidenden antiproliferativen und antiangiogenen Effekt von Temeirolimus hat.

Durch die systemische Applikation von Temeirolimus während der PBL konnte in der vorliegenden Dissertation das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen DTC und MM signifikant verringert werden. Zudem zeigte sich eine signifikante Reduktion der Tumorneoangiogenese [137].

Wie bereits erwähnt, kommt es während der PBL aufgrund der Atrophie des ligierten Leberlappens und der daraus resultierenden Ausschüttung von Wachstumsfaktoren zu neuem Tumorwachstum innerhalb des nicht-ligierten Leberlappens und zur Größenzunahme von bestehenden Metastasen im ligierten Leberlappen [8, 18, 37, 70, 77, 105, 147].

Des Weiteren wurde in vorangegangenen Arbeiten mehrfach bewiesen, dass durch Temeirolimus die VEGF-Expression und somit Angiogenese und Zellproliferation reduziert wird [44, 51, 65, 66]. VEGF hat einen entscheidenden Einfluss auf die Angiogenese und wird vermehrt in kolorektalen Metastasen exprimiert [160].

Zudem ist bekannt, dass Temeirolimus das Tumorwachstum von kolorektalen Lebermetastasen während der Regeneration nach Hepatektomie unterdrücken kann [111, 144, 145, 168].

Im Hinblick auf o. g. Erkenntnisse bzgl. PBL und Temeirolimus können die Ergebnisse dieser Arbeit dahingehend interpretiert werden, dass die Gabe von Temeirolimus während PBL in

der klinischen Praxis eine potente Option gegen die Entwicklung extrahepatischer kolorektaler Metastasen sein könnte.

6.2.3. Einfluss der Pfortaderastligatur auf etablierte extrahepatische kolorektale Metastasen (Versuchsteil B)

Die erhobenen Daten der vorliegenden Dissertation zeigen, dass die PBL während des gesamten Beobachtungszeitraumes von 14 Tagen keine proliferationsfördernde und neoangiogene Wirkung auf bereits bestehende extrahepatische kolorektale Metastasen zu haben scheint.

Es zeigte sich während der PBL eine geringere Gefäßdichte im Tumorzentrum und –rand, sowie ein niedrigerer Neoangiogenese-Score im Vergleich mit der Laparatomie-Kontrollgruppe. Zudem ergab sich weniger Tumorflächenzunahme und Muskelinfiltration.

Dies deckt sich mit den neusten Erkenntnissen von Giglio et al. [46]. Die Arbeitsgruppe analysierte 6 Studien, die innerhalb der letzten 10 Jahre erhoben wurden, und kam zu dem Ergebnis, dass die Pfortaderembolisation (PVE) vor ausgedehnter Leberresektion bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen keinen negativen Effekt auf das onkologische Outcome zu haben scheint. Hinsichtlich des 3- und 5-Jahres-Langzeitüberlebens fanden Giglio et al. keinen signifikanten Unterschied in den PVE- und Non-PVE-Gruppen [3, 12, 16, 106, 109, 110, 139, 149, 166]. Die meisten der analysierten Studien bezogen sich auf nicht-Leber-spezifische kolorektale Rezidive [77, 112, 162].

Ardito et al. [12] verglich das intrahepatische rezidivfreie Überleben von Patienten mit und ohne PVE. Hier zeigte sich ein deutlich früheres Auftreten von intrahepatischen Metastasen bei Patienten mit PVE. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Kollmar et al. [79], die im

Tiermodel ein beschleunigtes Wachstum intrahepatischer kolorektaler Metastasen zwischen Tag 14 und 21 nach PBL feststellten. Durch die konsekutive Zunahme des arteriellen Blutflusses innerhalb des ligierten Leberlappens und daraus resultierender massiver Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, kam es zu einem initial verzögertem und anschließend beschleunigtem Wachstum von intrahepatischen kolorektalen Metastasen.

So scheint anhand der Ergebnisse dieser Arbeit die PBL eher Einfluss auf das intrahepatische Metastasenwachstum zu haben und die Proliferation und Neoangiogenese von extrahepatischen kolorektalen Metastasen weniger zu beeinflussen.

6.2.4. Wirkung von Temeirolimus während Pfortaderastligatur auf extrahepatische kolorektale Metastasen (Versuchsteil B)

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass durch die Behandlung mit Temeirolimus während PBL die Progression von etablierten extrahepatischen kolorektalen Metastasen aufgehalten werden kann.

Dies zeigte sich in einer signifikanten Reduktion von Gefäßdichte in Tumorrand und –zentrum, sowie in einer deutlichen Verringerung des Neoangiogenese-Scores. Des Weiteren ergab sich eine Reduktion von Tumorgröße, Muskelinfiltration und Proliferation. Die Reduktion dieser Parameter war jedoch nicht signifikant.

Diese Ergebnisse sind mit den Daten aus vorangehenden Studien vergleichbar, in welchen mehrfach gezeigt wurde, dass Temeirolimus die VEGF-Expression, Angiogenese und Zellproliferation verringert [44, 51, 65, 66].

Zudem stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die bereits unter 6.2.3. diskutiert wurden („Die PBL scheint keine proliferationsfördernde und neoangiogene Wirkung auf bereits bestehende extrahepatische kolorektale Metastasen zu haben.“), diese Annahme.

Der „neoadjuvante Einsatz“ von Temsirolimus vor ausgedehnter Hepatektomie und während PBL könnte aufgrund der o. g. Ergebnisse zum Erreichen einer „stable disease“ bzgl. bereits bestehender extrahepatischer kolorektaler Metastasen sinnvoll sein.

6.3. Schlussfolgerung

Bereits bekannt ist, dass die PBL auf intrahepatische kolorektale disseminierte Tumorzellen, Mikrometastasen und etablierte Metastasen eine wachstumsfördernde und gefäßneubildende Wirkung hat. Dies wurde im Vorfeld dieser Disseration auch im Rahmen von Arbeiten der Arbeitsgruppe mehrfach aufgezeigt.

Erstmalig konnte in der hier vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass sich der proliferations- und neoangiogenesefördernde Effekt der PBL weniger als erwartet auf das Wachstumsverhalten von extrahepatischen kolorektalen DTC, MM und etablierten Metastasen auszuwirken scheint.

Zudem scheint die PBL die antiangiogene und proliferationshemmende Wirkung des mTOR-Inhibitors Temsirolimus nicht zu beeinträchtigen. Durch die Gabe von Temsirolimus während PBL konnte in dieser Arbeit das Anwachsen von extrahepatischen kolorektalen DTC und MM signifikant verringert und der weitere Progress von bereits etablierten extrahepatischen Metastasen aufgehalten werden. So könnte in der zukünftigen klinischen Behandlung der Einsatz von Temsirolimus vor ausgedehnter Hepatektomie und während PBL bei kolorektalen Metastasen eine vorteilhafte Option gegen die Entwicklung von neuen bzw.

gegen den weiteren Progress von bereits bestehenden extrahepatischen kolorektalen Metastasen sein.

7. Bibliographie

- [1] Abdalla, E. K. 2010. Portal vein embolization (prior to major hepatectomy) effects on regeneration, resectability, and outcome. *J Surg Oncol* 102, 8, 960–967.
- [2] Abdalla, E. K., Adam, R., Bilchik, A. J., Jaeck, D., Vauthey, J. N., and Mahvi, D. 2006. Improving resectability of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol* 13, 10, 1271–1280.
- [3] Abdalla, E. K., Barnett, C. C., Doherty, D., Curley, S. A., and Vauthey, J. N. 2002. Extended hepatectomy in patients with hepatobiliary malignancies with and without preoperative portal vein embolization. *Arch Surg* 137, 6, 675-80; discussion 680-1.
- [4] Abdalla, E. K., Vauthey, J. N., Ellis, L. M., Ellis, V., Pollock, R., Broglio, K. R., Hess, K., and Curley, S. A. 2004. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 239, 6, 818-25; discussion 825-7.
- [5] Abraham, R. T. 2004. PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* 3, 8-9, 883–887.
- [6] Abraham, R. T. and Gibbons, J. J. 2007. The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy. *Clin Cancer Res* 13, 11, 3109–3114.
- [7] Abulkhir A, Limongelli P, Healey AJ. 2008. Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg*.
- [8] Adam, R., Laurent, A., Azoulay, D., Castaing, D., and Bismuth, H. 2000. Two-stage hepatectomy: A planned strategy to treat irresectable liver tumors. *Ann Surg* 232, 6, 777–785.

- [9] Adam, R. and Levi, F. 2003. [Chemotherapy and surgery in the treatment of liver metastasis of colorectal cancer: a sacred union...]. *Ann Chir* 128 Spec No 1, 2–4.
- [10] Adson, M. A. 1987. Resection of liver metastases-when is it worthwhile? *World J Surg* 11, 4, 511–520.
- [11] Ansell, S. M., Inwards, D. J., Rowland, K. M., Flynn, P. J., Morton, R. F., Moore, D. F., Kaufmann, S. H., Ghobrial, I., Kurtin, P. J., Maurer, M., Allmer, C., and Witzig, T. E. 2008. Low-dose, single-agent temsirolimus for relapsed mantle cell lymphoma: a phase 2 trial in the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer* 113, 3, 508–514.
- [12] Ardito, F., Vellone, M., Barbaro, B., Grande, G., Clemente, G., Giovannini, I., Federico, B., Bonomo, L., Nuzzo, G., and Giuliante, F. 2013. Right and extended-right hepatectomies for unilobar colorectal metastases: impact of portal vein embolization on long-term outcome and liver recurrence. *Surgery* 153, 6, 801–810.
- [13] Atkins, M. B., Hidalgo, M., Stadler, W. M., Logan, T. F., Dutcher, J. P., Hudes, G. R., Park, Y., Liou, S. H., Marshall, B., Boni, J. P., Dukart, G., and Sherman, M. L. 2004. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 22, 5, 909–918.
- [14] Aussilhou, B., Lesurtel, M., Sauvanet, A., Farges, O., Dokmak, S., Goasguen, N., Sibert, A., Vilgrain, V., and Belghiti, J. 2008. Right portal vein ligation is as efficient as portal vein embolization to induce hypertrophy of the left liver remnant. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 12, 2, 297–303.
- [15] Azim, H., Azim, H. A., and Escudier, B. 2010. Targeting mTOR in cancer: renal cell is just a beginning. *Target Oncol* 5, 4, 269–280.

- [16] Azoulay, D., Castaing, D., Smail, A., Adam, R., Cailliez, V., Laurent, A., Lemoine, A., and Bismuth, H. 2000. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. *Ann Surg* 231, 4, 480–486.
- [17] Ballou, L. M. and Lin, R. Z. 2008. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. *J Chem Biol* 1, 1-4, 27–36.
- [18] Barbaro, B., Di Stasi, C., Nuzzo, G., Vellone, M., Giuliente, F., and Marano, P. 2003. Preoperative right portal vein embolization in patients with metastatic liver disease. Metastatic liver volumes after RPVE. *Acta Radiol* 44, 1, 98–102.
- [19] Becker, H. and Ghadimi, M. B., Eds. 2015. *Allgemein- und Viszeralchirurgie II. Spezielle operative Techniken*. Elsevier Urban & Fischer, München.
- [20] Berchtold, R., Bruch, H.-P., and Keller, R. 2006. *Chirurgie. 335 Tabellen und 343 Praxisfragen ; [nach neuer AO ; plus DVD]*. Elsevier Urban & Fischer, München.
- [21] Bilchik, A. J., Hoon, D. S., Saha, S., Turner, R. R., Wiese, D., DiNome, M., Koyanagi, K., McCarter, M., Shen, P., Iddings, D., Chen, S. L., Gonzalez, M., Elashoff, D., and Morton, D. L. 2007. Prognostic impact of micrometastases in colon cancer: interim results of a prospective multicenter trial. *Ann Surg* 246, 4, 568-75; discussion 575-7.
- [22] Bosch, B., Guller, U., Schnider, A., Maurer, R., Harder, F., Metzger, U., and Marti, W. R. 2003. Perioperative detection of disseminated tumour cells is an independent prognostic factor in patients with colorectal cancer. *Br J Surg* 90, 7, 882–888.
- [23] Broering, D. C., Hillert, C., Krupski, G., Fischer, L., Mueller, L., Achilles, E. G., Am Schulte Esch, J., and Rogiers, X. 2002. Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J Gastrointest Surg* 6, 6, 905-13; discussion 913.

- [24] Capussotti, L., Muratore, A., Mulas, M. M., Massucco, P., and Aglietta, M. 2006. Neoadjuvant chemotherapy and resection for initially irresectable colorectal liver metastases. *Br J Surg* 93, 8, 1001–1006.
- [25] Chawla, SP, and al., e. 2006. Updated results of a phase II trial of AP23573, a novel mTOR inhibitor, in patients (pts) with advanced soft tissue or bone sarcomas. *J Clin Oncol* 24(suppl), 521s, abstr 9505.
- [26] Chen, S. L. and Bilchik, A. J. 2006. More extensive nodal dissection improves survival for stages I to III of colon cancer: a population-based study. *Ann Surg* 244, 4, 602–610.
- [27] Chiang, G. G. and Abraham, R. T. 2007. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med* 13, 10, 433–442.
- [28] Choti, M. A., Sitzmann, J. V., Tiburi, M. F., Sumetchotimetha, W., Rangsin, R., Schulick, R. D., Lillemoe, K. D., Yeo, C. J., and Cameron, J. L. 2002. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* 235, 6, 759–766.
- [29] Chu, K. K. W. and Cheung, T. T. 2015. Update in management of hepatocellular carcinoma in Eastern population. *World journal of hepatology* 7, 11, 1562–1571.
- [30] Clavien, P. A., Petrowsky, H., DeOliveira, M. L., and Graf, R. 2007. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* 356, 15, 1545–1559.
- [31] Colombo, N, and al, e. 2007. A phase II trial of the mTOR inhibitor AP23573 as a single agent in advanced endometrial cancer. *J Clin Oncol* 25(suppl), 278s, abstr 5516.
- [32] Covey, A. M., Brown, K. T., Jarnagin, W. R., Brody, L. A., Schwartz, L., Tuorto, S., Sofocleous, C. T., D'Angelica, M., Getrajdman, G. I., DeMatteo, R., Kemeny, N. E., and Fong, Y. 2008. Combined portal vein embolization and neoadjuvant chemotherapy as a treatment strategy for resectable hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* 247, 3, 451–455.

- [33] Denys, A. L., Abehsera, M., Sauvanet, A., Sibert, A., Belghiti, J., and Menu, Y. 1999. Failure of right portal vein ligation to induce left lobe hypertrophy due to intrahepatic portoportal collaterals: successful treatment with portal vein embolization. *AJR Am J Roentgenol* 173, 3, 633–635.
- [34] Douros, J. and Suffness, M. 1981. New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat Rev* 8, 1, 63–87.
- [35] Eadens, M. J. and Grothey, A. 2011. Curable metastatic colorectal cancer. *Curr Oncol Rep* 13, 3, 168–176.
- [36] Edge, S. B. and Compton, C. C. 2010. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 17, 6, 1471–1474.
- [37] Elias, D., Baere, T. de, Roche, A., Mducreux, Leclere, J., and Lasser, P. 1999. During liver regeneration following right portal embolization the growth rate of liver metastases is more rapid than that of the liver parenchyma. *Br J Surg* 86, 6, 784–788.
- [38] Engelman, J. A. 2009. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 9, 8, 550–562.
- [39] Faivre, J., Manfredi, S., and Bouvier, A. M. 2003. [Epidemiology of colorectal cancer liver metastases]. *Bull Acad Natl Med* 187, 5, 815-22; discussion 822-3.
- [40] Fasano, M., Fabozzi, A., Giordano, G., Venturini, F., Aurilio, G., Cantile, F., Fabozzi, T., Ricci, V., Santabarbara, G., Morgillo, F., Ciardiello, F., and Vita, F. de. 2017. Complete response to capecitabine in a frail, elderly patient with metastatic colorectal cancer: A case report. *Oncology letters* 13, 2, 979–983.
- [41] Fasolo, A. and Sessa, C. 2012. Targeting mTOR pathways in human malignancies. *Curr Pharm Des* 18, 19, 2766–2777.

- [42] Fingar, D. C. and Blenis, J. 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23, 18, 3151–3171.
- [43] Fong, Y., Cohen, A. M., Fortner, J. G., Enker, W. E., Turnbull, A. D., Coit, D. G., Marrero, A. M., Prasad, M., Blumgart, L. H., and Brennan, M. F. 1997. Liver resection for colorectal metastases. *J Clin Oncol* 15, 3, 938–946.
- [44] Frost, P., Berlinger, E., Mysore, V., Hoang, B., Shi, Y., Gera, J., and Lichtenstein, A. 2013. Mammalian target of rapamycin inhibitors induce tumor cell apoptosis in vivo primarily by inhibiting VEGF expression and angiogenesis. *J Oncol* 2013, 897025.
- [45] Galizia, G., Lieto, E., Orditura, M., Castellano, P., Imperatore, V., Pinto, M., and Zamboli, A. 2008. First-line chemotherapy vs bowel tumor resection plus chemotherapy for patients with unresectable synchronous colorectal hepatic metastases. *Arch Surg* 143, 4, 352-8; discussion 358.
- [46] Giglio, M. C., Giakoustidis, A., Draz, A., Jawad, Z. A., Pai, M., Habib, N. A., Tait, P., Frampton, A. E., and Jiao, L. R. 2016. Oncological Outcomes of Major Liver Resection Following Portal Vein Embolization: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 23, 11, 3709–3717.
- [47] Gómez-Martín, C., Rubio-Viqueira, B., and Hidalgo, M. 2005. Current status of mammalian target of rapamycin inhibitors in lung cancer. *Clin Lung Cancer* 7 Suppl 1, S13-8.
- [48] Grant, S., Qiao, L., and Dent, P. 2002. Roles of ERBB family receptor tyrosine kinases, and downstream signaling pathways, in the control of cell growth and survival. *Front Biosci* 7, d376-89.

- [49] Gridelli, C., Maione, P., and Rossi, A. 2008. The potential role of mTOR inhibitors in non-small cell lung cancer. *Oncologist* 13, 2, 139–147.
- [50] Gu, Y., Scheuer, C., Feng, D., Menger, M. D., and Laschke, M. W. 2013. Inhibition of angiogenesis: a novel antitumor mechanism of the herbal compound arctigenin. *Anticancer Drugs* 24, 8, 781–791.
- [51] Guba, M., Breitenbuch, P. von, Steinbauer, M., Koehl, G., Flegel, S., Hornung, M., Bruns, C. J., Zuelke, C., Farkas, S., Anthuber, M., Jauch, K. W., and Geissler, E. K. 2002. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 8, 2, 128–135.
- [52] Guertin, D. A. and Sabatini, D. M. 2005. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 11, 8, 353–361.
- [53] Guertin, D. A. and Sabatini, D. M. 2009. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal* 2, 67, pe24.
- [54] Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 2, 177–189.
- [55] Henne-Bruns, D., Kremer, B., Dürig, M., and Barth, H., Eds. 2008. *Chirurgie. 311 Tabellen*. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart.
- [56] Herold, G., Ed. 2016. *Innere Medizin 2016. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Selbstverl., Köln.
- [57] Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., Hanushevsky, O., Clancy, J., Hewes, B., Moore, L., and Coiffier, B. 2009. Phase III study to evaluate temsirolimus compared

- with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 27, 23, 3822–3829.
- [58] Hidalgo, M., Buckner, J. C., Erlichman, C., Pollack, M. S., Boni, J. P., Dukart, G., Marshall, B., Speicher, L., Moore, L., and Rowinsky, E. K. 2006. A phase I and pharmacokinetic study of temsirolimus (CCI-779) administered intravenously daily for 5 days every 2 weeks to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 12, 19, 5755–5763.
- [59] Hirai, I., Kimura, W., Fuse, A., Suto, K., and Urayama, M. 2003. Evaluation of preoperative portal embolization for safe hepatectomy, with special reference to assessment of nonembolized lobe function with ^{99m}Tc-GSA SPECT scintigraphy. *Surgery* 133, 5, 495–506.
- [60] Hohenberger, P. 2001. Colorectal cancer-what is standard surgery? *Eur J Cancer* 37 Suppl 7, S173-87.
- [61] Hölscher, A. H., Schleimer, K., Beckurts, K. T., Brochhagen, H. G., and Stippel, D. L. 2003. [Right portal vein ligation prior to extended right hemihepatectomy for synchronous colorectal liver metastases]. *Chirurg* 74, 9, 860–865.
- [62] Huang, C. H., Mandelker, D., Schmidt-Kittler, O., Samuels, Y., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Gabelli, S. B., and Amzel, L. M. 2007. The structure of a human p110 α /p85 α complex elucidates the effects of oncogenic PI3K α mutations. *Science* 318, 5857, 1744–1748.
- [63] Huang, S., Bjornsti, M. A., and Houghton, P. J. 2003. Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol Ther* 2, 3, 222–232.
- [64] Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., Kovacevic, Z., Lesovoy, V., Schmidt-Wolf, I.

- G., Barbarash, O., Gokmen, E., O'Toole, T., Lustgarten, S., Moore, L., Motzer, R. J., and Trial, G. A. 2007. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356, 22, 2271–2281.
- [65] Hudson, C. C., Liu, M., Chiang, G. G., Otterness, D. M., Loomis, D. C., Kaper, F., Giaccia, A. J., and Abraham, R. T. 2002. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 22, 20, 7004–7014.
- [66] Humar, R., Kiefer, F. N., Berns, H., Resink, T. J., and Battegay, E. J. 2002. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *FASEB J* 16, 8, 771–780.
- [67] Ijichi, M., Makuuchi, M., Imamura, H., and Takayama, T. 2001. Portal embolization relieves persistent jaundice after complete biliary drainage. *Surgery* 130, 1, 116–118.
- [68] Jaeck, D., Oussoultzoglou, E., Rosso, E., Greget, M., Weber, J. C., and Bachellier, P. 2004. A two-stage hepatectomy procedure combined with portal vein embolization to achieve curative resection for initially unresectable multiple and bilobar colorectal liver metastases. *Ann Surg* 240, 6, 1037-49; discussion 1049-51.
- [69] Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., and Thun, M. J. 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59, 4, 225–249.
- [70] Jong, K. P. de, Lont, H. E., Bijma, A. M., Brouwers, M. A., Vries, E. G. de, van Veen, M. L., Marquet, R. L., Slooff, M. J., and Terpstra, O. T. 1995. The effect of partial hepatectomy on tumor growth in rats: in vivo and in vitro studies. *Hepatology* 22, 4 Pt 1, 1263–1272.
- [71] Jong, M. C. de, Pulitano, C., Ribero, D., Strub, J., Mentha, G., Schulick, R. D., Choti, M. A., Aldrighetti, L., Capussotti, L., and Pawlik, T. M. 2009. Rates and patterns of

- recurrence following curative intent surgery for colorectal liver metastasis: an international multi-institutional analysis of 1669 patients. *Ann Surg* 250, 3, 440–448.
- [72] Khatri, V. P., Petrelli, N. J., and Belghiti, J. 2005. Extending the frontiers of surgical therapy for hepatic colorectal metastases: is there a limit? *J Clin Oncol* 23, 33, 8490–8499.
- [73] Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 2, 163–175.
- [74] Kino, T., Hatanaka, H., Miyata, S., Inamura, N., Nishiyama, M., Yajima, T., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., and Aoki, H. 1987. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 40, 9, 1256–1265.
- [75] Kinoshita, H., Sakai, K., Hirohashi, K., Igawa, S., Yamasaki, O., and Kubo, S. 1986. Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 10, 5, 803–808.
- [76] Knowles, K. J., Chen, S., and Herrera, G. A. 2017. Metastatic Colonic Adenocarcinoma to the Extrahepatic Common Bile Duct: The Critical Role of the Pathologist and Immunohistochemistry in Guiding Patient Care Decisions. *The American journal of case reports* 18, 263–266.
- [77] Kokudo, N., Tada, K., Seki, M., Ohta, H., Azekura, K., Ueno, M., Ohta, K., Yamaguchi, T., Matsubara, T., Takahashi, T., Nakajima, T., Muto, T., Ikari, T., Yanagisawa, A., and Kato, Y. 2001. Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal vein embolization. *Hepatology* 34, 2, 267–272.

- [78] Kollmar, O., Corsten, M., Scheuer, C., Vollmar, B., Schilling, M. K., and Menger, M. D. 2007. Portal branch ligation induces a hepatic arterial buffer response, microvascular remodeling, normoxygenation, and cell proliferation in portal blood-deprived liver tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, 6, G1534-42.
- [79] Kollmar, O., Corsten, M., Scheuer, C., Vollmar, B., Schilling, M. K., and Menger, M. D. 2010. Tumour growth following portal branch ligation in an experimental model of liver metastases. *Br J Surg* 97, 6, 917–926.
- [80] Kollmar, O., Junker, B., Rupertus, K., Menger, M. D., and Schilling, M. K. 2007. Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis. *Eur J Surg Oncol* 33, 6, 803–811.
- [81] Kollmar, O., Junker, B., Rupertus, K., Scheuer, C., Menger, M. D., and Schilling, M. K. 2008. Liver resection-associated macrophage inflammatory protein-2 stimulates engraftment but not growth of colorectal metastasis at extrahepatic sites. *J Surg Res* 145, 2, 295–302.
- [82] Kollmar, O., Menger, M. D., and Schilling, M. K. 2006. Macrophage inflammatory protein-2 contributes to liver resection-induced acceleration of hepatic metastatic tumor growth. *World J Gastroenterol* 12, 6, 858–867.
- [83] Kollmar, O., Rupertus, K., Scheuer, C., Nickels, R. M., Haberl, G. C. Y., Tilton, B., Menger, M. D., and Schilling, M. K. 2010. CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *International journal of cancer* 126, 6, 1302–1315.
- [84] Kopetz, S., Chang, G. J., Overman, M. J., Eng, C., Sargent, D. J., Larson, D. W., Grothey, A., Vauthey, J. N., Nagorney, D. M., and McWilliams, R. R. 2009. Improved

- survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol* 27, 22, 3677–3683.
- [85] Koyanagi, K., Bilchik, A. J., Saha, S., Turner, R. R., Wiese, D., McCarter, M., Shen, P., Deacon, L., Elashoff, D., and Hoon, D. S. 2008. Prognostic relevance of occult nodal micrometastases and circulating tumor cells in colorectal cancer in a prospective multicenter trial. *Clin Cancer Res* 14, 22, 7391–7396.
- [86] Krasilnikov, M. A. 2000. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc)* 65, 1, 59–67.
- [87] Kubota, K., Makuuchi, M., Kusaka, K., Kobayashi, T., Miki, K., Hasegawa, K., Harihara, Y., and Takayama, T. 1997. Measurement of liver volume and hepatic functional reserve as a guide to decision-making in resectional surgery for hepatic tumors. *Hepatology* 26, 5, 1176–1181.
- [88] Laschke, M. W., Mussawy, H., Schuler, S., Eglin, D., Alini, M., and Menger, M. D. 2010. Promoting external inosculation of prevascularised tissue constructs by pre-cultivation in an angiogenic extracellular matrix. *Eur Cell Mater* 20, 356–366.
- [89] Lehr, H. A., Leunig, M., Menger, M. D., Nolte, D., and Messmer, K. 1993. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143, 4, 1055–1062.
- [90] Lévi, F., Zidani, R., and Misset, J. L. 1997. Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer. International Organization for Cancer Chronotherapy. *Lancet* 350, 9079, 681–686.

- [91] Lim, A., Le Sourd, S., Senellart, H., Luet, D., Douane, F., Perret, C., Bouvier, A., Métairie, S., Cauchin, E., Rougier, P., Matysiak-Budnik, T., and Toucheffeu, Y. 2017. Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy for Unresectable Liver Metastases of Colorectal Cancer: A Multicenter Retrospective Study. *Clinical colorectal cancer*.
- [92] Lim, C. and Farges, O. 2012. Portal vein occlusion before major hepatectomy in patients with colorectal liver metastases: rationale, indications, technical aspects, complications and outcome. *J Visc Surg* 149, 2, e86-96.
- [93] Lindnér, P., Cahlin, C., Friman, S., Hafstrom, L., Klingenstierna, H., Lonn, L., Olausson, M., and Rizell, M. 2006. Extended right-sided liver resection for colorectal liver metastases-impact of percutaneous portal venous embolisation. *Eur J Surg Oncol* 32, 3, 292–296.
- [94] Lund, C. M., Vistisen, K. K., Dehlendorff, C., Rønholt, F., Johansen, J. S., and Nielsen, D. L. 2017. The effect of geriatric intervention in frail elderly patients receiving chemotherapy for colorectal cancer: a randomized trial (GERICO). *BMC cancer* 17, 1, 448.
- [95] Luu, C., Arrington, A. K., Schoellhammer, H. F., Singh, G., and Kim, J. 2013. Targeted therapies in colorectal cancer: surgical considerations. *J Gastrointest Oncol* 4, 3, 328–336.
- [96] Makuuchi, M., Thai, B. L., Takayasu, K., Takayama, T., Kosuge, T., Gunvén, P., Yamazaki, S., Hasegawa, H., and Ozaki, H. 1990. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery* 107, 5, 521–527.
- [97] Manning, B. D. and Cantley, L. C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 7, 1261–1274.

- [98] Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B., and Wymann, M. P. 2008. Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta* 1784, 1, 159–185.
- [99] Martel, R. R., Klicius, J., and Galet, S. 1977. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol* 55, 1, 48–51.
- [100] Menger, M. D., Laschke, M. W., and Vollmar, B. 2002. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34, 1-2, 83–91.
- [101] Menger, M. D. and Lehr, H. A. 1993. Scope and perspectives of intravital microscopy-bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14, 11, 519–522.
- [102] Meric-Bernstam, F. and Gonzalez-Angulo, A. M. 2009. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol* 27, 13, 2278–2287.
- [103] Misiakos, E. P., Karidis, N. P., and Kouraklis, G. 2011. Current treatment for colorectal liver metastases. *World journal of gastroenterology* 17, 36, 4067–4075.
- [104] Moertel, C. G. 1994. Chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 330, 16, 1136–1142.
- [105] Mueller, L., Goettsche, J., Abdulgawad, A., Vashist, Y. K., Meyer, J., Wilms, C., Hillert, C., Rogiers, X., and Broering, D. C. 2005. Tumor growth-promoting cellular host response during liver atrophy after portal occlusion. *Liver Int* 25, 5, 994–1001.
- [106] Mueller, L., Hillert, C., Möller, L., Krupski-Berdien, G., Rogiers, X., and Broering, D. C. 2008. Major hepatectomy for colorectal metastases: is preoperative portal occlusion an oncological risk factor? *Ann Surg Oncol* 15, 7, 1908–1917.

- [107] Nagano, Y., Nagahori, K., Kamiyama, M., Fujii, Y., Kubota, T., Endo, I., Togo, S., and Shimada, H. 2002. Improved functional reserve of hypertrophied contra lateral liver after portal vein ligation in rats. *J Hepatol* 37, 1, 72–77.
- [108] Nagano, Y., Nagahori, K., Yoshiro, F., Hamaguchi, Y., Ishikawa, T., Ichikawa, Y., Togo, S., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., and Shimada, H. 2004. Gene expression profile analysis of regenerating liver after portal vein ligation in rats by a cDNA microarray system. *Liver Int* 24, 3, 253–258.
- [109] Nikfarjam, M., Shereef, S., Kimchi, E. T., Gusani, N. J., Jiang, Y., Avella, D. M., Mahraj, R. P., and Staveley-O'Carroll, K. F. 2009. Survival outcomes of patients with colorectal liver metastases following hepatic resection or ablation in the era of effective chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 16, 7, 1860–1867.
- [110] Oussoultzoglou, E., Bachellier, P., Rosso, E., Scurtu, R., Lucescu, I., Greget, M., and Jaeck, D. 2006. Right portal vein embolization before right hepatectomy for unilobar colorectal liver metastases reduces the intrahepatic recurrence rate. *Ann Surg* 244, 1, 71–79.
- [111] Palmes, D., Zibert, A., Budny, T., Bahde, R., Minin, E., Kepschull, L., Hölzen, J., Schmidt, H., and Spiegel, H. U. 2008. Impact of rapamycin on liver regeneration. *Virchows Arch* 452, 5, 545–557.
- [112] Pamecha, V., Glantzounis, G., Davies, N., Fusai, G., Sharma, D., and Davidson, B. 2009. Long-term survival and disease recurrence following portal vein embolisation prior to major hepatectomy for colorectal metastases. *Ann Surg Oncol* 16, 5, 1202–1207.
- [113] Papadimitriou, J. D., Fotopoulos, A. C., Prahalias, A. A., Vassiliou, J. G., and Papadimitriou, L. J. 2001. The impact of new technology on hepatic resection for malignancy. *Arch Surg* 136, 11, 1307–1313.

- [114] Park, E. J., Baik, S. H., Hur, H., Min, B. S., Kang, J., Han, Y. D., Cho, M. S., Lee, K. Y., and Kim, N. K. 2017. Cytoreductive surgery with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for appendiceal and colorectal cancer with peritoneal carcinomatosis: Clinical outcomes at 2 tertiary referral centers in Korea. *Medicine* 96, 21, e6632.
- [115] Pisick, E., Jagadeesh, S., and Salgia, R. 2004. Receptor tyrosine kinases and inhibitors in lung cancer. *ScientificWorldJournal* 4, 589–604.
- [116] Poston, G. J., Adam, R., Alberts, S., Curley, S., Figueras, J., Haller, D., Kunstlinger, F., Mentha, G., Nordlinger, B., Patt, Y., Primrose, J., Roh, M., Rougier, P., Ruers, T., Schmoll, H. J., Valls, C., Vauthey, N. J., Cornelis, M., and Kahan, J. P. 2005. OncoSurge: a strategy for improving resectability with curative intent in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23, 28, 7125–7134.
- [117] Rees, M. and John, T. G. 2001. Current status of surgery in colorectal metastases to the liver. *Hepatogastroenterology* 48, 38, 341–344.
- [118] Rees, M., Tekkis, P. P., Welsh, F. K., O'Rourke, T., and John, T. G. 2008. Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients. *Ann Surg* 247, 1, 125–135.
- [119] Ribero, D., Abdalla, E. K., Madoff, D. C., Donadon, M., Loyer, E. M., and Vauthey, J. N. 2007. Portal vein embolization before major hepatectomy and its effects on regeneration, resectability and outcome. *Br J Surg* 94, 11, 1386–1394.
- [120] Riechelmann, R. and Grothey, A. 2017. Antiangiogenic therapy for refractory colorectal cancer: current options and future strategies. *Therapeutic advances in medical oncology* 9, 2, 106–126.
- [121] Rougier, P., van Cutsem, E., Bajetta, E., Niederle, N., Possinger, K., Labianca, R., Navarro, M., Morant, R., Bleiberg, H., Wils, J., Awad, L., Herait, P., and Jacques, C.

1998. Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 352, 9138, 1407–1412.
- [122] Roux, P. P. and Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 2, 320–344.
- [123] Rupertus, K., Dahlem, C., Menger, M. D., Schilling, M. K., and Kollmar, O. 2009. Rapamycin inhibits hepatectomy-induced stimulation of metastatic tumor growth by reduction of angiogenesis, microvascular blood perfusion, and tumor cell proliferation. *Ann Surg Oncol* 16, 9, 2629–2637.
- [124] Sakai, N., Clarke, C. N., Schuster, R., Blanchard, J., Tevar, A. D., Edwards, M. J., and Lentsch, A. B. 2010. Portal vein ligation accelerates tumor growth in ligated, but not contralateral lobes. *World journal of gastroenterology* 16, 30, 3816–3826.
- [125] Samalavicius, N. E., Dulskas, A., Baltruskeviciene, E., Smailyte, G., Skuciene, M., Mikelenaitė, R., Venslovaite, R., Aleknavicius, E., Samalavicius, A., and Lunevicius, R. 2016. Asymptomatic primary tumour in incurable metastatic colorectal cancer: is there a role for surgical resection prior to systematic therapy or not? *Wideochirurgia i inne techniki maloinwazyjne = Videosurgery and other miniinvasive techniques* 11, 4, 274–282.
- [126] Sandison J C. 1928. The transparent chamber of the rabbit's ear giving a complete description of improved techniques of construction and introduction and general account of growth and behavior of living cells and tissues as seen with the microscope. *Am J Anat*, 41, 447-472.

- [127] Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 14, 1296–1302.
- [128] Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 5712, 1098–1101.
- [129] Saunders, R. N., Metcalfe, M. S., and Nicholson, M. L. 2001. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int* 59, 1, 3–16.
- [130] Scheele, J., Stang, R., Altendorf-Hofmann, A., and Paul, M. 1995. Resection of colorectal liver metastases. *World J Surg* 19, 1, 59–71.
- [131] Schimanski, C. C., Möhler, M., Zimmermann, T., Gockel, I., Lang, H., Arbogast, R., Jäger, D., Galle, P. R., and Berger, M. R. 2010. [Detection of hepatic micrometastases in the context of adjuvant chemotherapy and surgery for hepatic metastases]. *Dtsch Med Wochenschr* 135, 21, 1078–1082.
- [132] Schmelzle, T. and Hall, M. N. 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103, 2, 253–262.
- [133] Schreiber, S. L. 1991. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251, 4991, 283–287.
- [134] Sehgal, S. N. 1998. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem* 31, 5, 335–340.
- [135] Sehgal, S. N., Baker, H., and Vezina, C. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics* 28, 10, 727–732.

- [136] Senger, S., Kollmar, O., Menger, M. D., and Rupertus, K. 2016. Darbepoetin- α Promotes Cell Proliferation in Established Extrahepatic Colorectal Tumors after Major Hepatectomy. *Eur Surg Res* 56, 1-2, 49–60.
- [137] Senger, S., Sperling, J., Oberkircher, B., Schilling, M. K., Kollmar, O., Menger, M. D., and Ziemann, C. 2017. Portal branch ligation does not counteract the inhibiting effect of temsirolimus on extrahepatic colorectal metastatic growth. *Clinical & experimental metastasis*.
- [138] Shimada, H., Tanaka, K., Endou, I., and Ichikawa, Y. 2009. Treatment for colorectal liver metastases: a review. *Langenbecks Arch Surg* 394, 6, 973–983.
- [139] Shindoh, J., Tzeng, C. W., Aloia, T. A., Curley, S. A., Zimmitti, G., Wei, S. H., Huang, S. Y., Gupta, S., Wallace, M. J., and Vauthey, J. N. 2013. Portal vein embolization improves rate of resection of extensive colorectal liver metastases without worsening survival. *Br J Surg* 100, 13, 1777–1783.
- [140] Shirabe, K., Shimada, M., Gion, T., Hasegawa, H., Takenaka, K., Utsunomiya, T., and Sugimachi, K. 1999. Postoperative liver failure after major hepatic resection for hepatocellular carcinoma in the modern era with special reference to remnant liver volume. *J Am Coll Surg* 188, 3, 304–309.
- [141] Sirop, S., Kanaan, M., Korant, A., Wiese, D., Eilender, D., Nagpal, S., Arora, M., Singh, T., and Saha, S. 2011. Detection and prognostic impact of micrometastasis in colorectal cancer. *Journal of surgical oncology* 103, 6, 534–537.
- [142] Slomovitz, B., and M. 2008. A phase II study of oral mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, RAD001 (everolimus) in patients with recurrent endometrial carcinoma (EC). *J Clin Oncol* 26(suppl), 293s, abstr 5502.

- [143] Smith, S. M., van Besien, K., Karrison, T., Dancey, J., McLaughlin, P., Younes, A., Smith, S., Stiff, P., Lester, E., Modi, S., Doyle, L. A., Vokes, E. E., and Pro, B. 2010. Temsirolimus has activity in non-mantle cell non-Hodgkin's lymphoma subtypes: The University of Chicago phase II consortium. *J Clin Oncol* 28, 31, 4740–4746.
- [144] Sperling, J., Ziemann, C., Gittler, A., Benz-Weißer, A., Menger, M. D., and Kollmar, O. 2013. Hepatic arterial infusion of temsirolimus inhibits tumor growth of colorectal rat liver metastases even after a growth stimulating procedure like liver resection. *J Surg Res* 185, 2, 587–594.
- [145] Sperling, J., Ziemann, C., Gittler, A., Benz-Weisser, A., Menger, M. D., and Kollmar, O. 2015. Tumour growth of colorectal rat liver metastases is inhibited by hepatic arterial infusion of the mTOR-inhibitor temsirolimus after portal branch ligation. *Clinical & experimental metastasis* 32, 4, 313–321.
- [146] Stillwell, A. P., Ho, Y. H., and Veitch, C. 2011. Systematic review of prognostic factors related to overall survival in patients with stage IV colorectal cancer and unresectable metastases. *World J Surg* 35, 3, 684–692.
- [147] Takayama, T., Makuuchi, M., Hirohashi, S., Sakamoto, M., Yamamoto, J., Shimada, K., Kosuge, T., Okada, S., Takayasu, K., and Yamasaki, S. 1998. Early hepatocellular carcinoma as an entity with a high rate of surgical cure. *Hepatology* 28, 5, 1241–1246.
- [148] Tamagawa, K., Horiuchi, T., Uchinami, M., Doi, K., Yoshida, M., Nakamura, T., Sasaki, H., Taniguchi, M., and Tanaka, K. 2008. Hepatic ischemia-reperfusion increases vascular endothelial growth factor and cancer growth in rats. *The Journal of surgical research* 148, 2, 158–163.

- [149] Tanaka, K., Shimada, H., Ueda, M., Matsuo, K., Endo, I., and Togo, S. 2007. Long-term characteristics of 5-year survivors after liver resection for colorectal metastases. *Ann Surg Oncol* 14, 4, 1336–1346.
- [150] Tannenbaum, C. S., Wicker, N., Armstrong, D., Tubbs, R., Finke, J., Bukowski, R. M., and Hamilton, T. A. 1996. Cytokine and chemokine expression in tumors of mice receiving systemic therapy with IL-12. *J Immunol* 156, 2, 693–699.
- [151] Tessier, M. and Woodgett, J. R. 2006. Serum and glucocorticoid-regulated protein kinases: variations on a theme. *J Cell Biochem* 98, 6, 1391–1407.
- [152] Uesaka, K., Nimura, Y., and Nagino, M. 1996. Changes in hepatic lobar function after right portal vein embolization. An appraisal by biliary indocyanine green excretion. *Ann Surg* 223, 1, 77–83.
- [153] van Cutsem, E., Gramont, A. de, Henning, G., Rougier, P., Bonnetain, F., and Seufferlein, T. 2017. Improving Outcomes in Patients with CRC: The Role of Patient Reported Outcomes-An ESDO Report. *Cancers* 9, 6.
- [154] van der Bilt, J. D. W., Kranenburg, O., Nijkamp, M. W., Smakman, N., Veenendaal, L. M., Te Velde, E. A., Voest, E. E., van Diest, P. J., and Borel Rinkes, I. H. M. 2005. Ischemia/reperfusion accelerates the outgrowth of hepatic micrometastases in a highly standardized murine model. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 42, 1, 165–175.
- [155] Vatandoust, S., Price, T. J., and Karapetis, C. S. 2015. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World journal of gastroenterology* 21, 41, 11767–11776.
- [156] Vézina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S. N. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 28, 10, 721–726.

- [157] Vivanco, I. and Sawyers, C. L. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 7, 489–501.
- [158] Wander, S. A., Hennessy, B. T., and Slingerland, J. M. 2011. Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J Clin Invest* 121, 4, 1231–1241.
- [159] Wanebo, H. J., LeGolvan, M., Paty, P. B., Saha, S., Zuber, M., D'Angelica, M. I., and Kemeny, N. E. 2012. Meeting the biologic challenge of colorectal metastases. *Clin Exp Metastasis* 29, 7, 821–839.
- [160] Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Gillett, N. A., and Ferrara, N. 1995. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *The Journal of clinical investigation* 95, 4, 1789–1797.
- [161] Weiss, L., Grundmann, E., Torhorst, J., Hartveit, F., Moberg, I., Eder, M., Fenoglio-Preiser, C. M., Napier, J., Horne, C. H., and Lopez, M. J. 1986. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol* 150, 3, 195–203.
- [162] Wicherts, D. A., Haas, R. J. de, Andreani, P., Sotirov, D., Salloum, C., Castaing, D., Adam, R., and Azoulay, D. 2010. Impact of portal vein embolization on long-term survival of patients with primarily unresectable colorectal liver metastases. *Br J Surg* 97, 2, 240–250.
- [163] Wilson, S. M. and Adson, M. A. 1976. Surgical treatment of hepatic metastases from colorectal cancers. *Arch Surg* 111, 4, 330–334.
- [164] Witzig, T. E., Geyer, S. M., Ghobrial, I., Inwards, D. J., Fonseca, R., Kurtin, P., Ansell, S. M., Luyun, R., Flynn, P. J., Morton, R. F., Dakhil, S. R., Gross, H., and Kaufmann, S.

- H. 2005. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 23, 23, 5347–5356.
- [165] Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 3, 471–484.
- [166] Yamashita, S., Hasegawa, K., Takahashi, M., Inoue, Y., Sakamoto, Y., Aoki, T., Sugawara, Y., and Kokudo, N. 2013. One-stage hepatectomy following portal vein embolization for colorectal liver metastasis. *World J Surg* 37, 3, 622–628.
- [167] Yee, K. W., Zeng, Z., Konopleva, M., Verstovsek, S., Ravandi, F., Ferrajoli, A., Thomas, D., Wierda, W., Apostolidou, E., Albitar, M., O'Brien, S., Andreeff, M., and Giles, F. J. 2006. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 12, 17, 5165–5173.
- [168] Yuge, R., Kitadai, Y., Shinagawa, K., Onoyama, M., Tanaka, S., Yasui, W., and Chayama, K. 2015. mTOR and PDGF pathway blockade inhibits liver metastasis of colorectal cancer by modulating the tumor microenvironment. *The American journal of pathology* 185, 2, 399–408.
- [169] Zalinski, S., Mariette, C., Farges, O., SFCD-ACHBT evaluation committee : A. Alves, I. B.-g. C. C. J. C. C. D. O. D. D. F. D. G. M. K. J. L. P. P. G. S. O. T. E. V. J. W., Surgery, F. S. o. G., Surgery, A. o. H., and Transplantation, L. 2011. Management of patients with synchronous liver metastases of colorectal cancer. Clinical practice guidelines. Guidelines of the French society of gastrointestinal surgery (SFCD) and of the association of hepatobiliary surgery and liver transplantation (ACHBT). Short version. *J Visc Surg* 148, 3, e171-82.

- [170] Zeelenberg, I. S., Ruuls-Van Stalle, L., and Roos, E. 2003. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 63, 13, 3833–3839.
- [171] Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch Instituts und des deutschen Krebsforschungszentrums in der Helmholtzgemeinschaft. 2017. *Darmkrebs*.

8. Publikationen

Publikationen zu dieser Arbeit

Senger S, Sperling J, **Oberkircher B**, Schilling MK, Kollmar O, Menger MD, Ziemann C. Portal branch ligation does not counteract the inhibiting effect of temsirolimus on extrahepatic colorectal metastatic growth. *Clinical & Experimental Metastasis*, accepted 5-2017, in press.

Publizierte Abstracts/Poster/Vorträge

Senger S, Dold S, **Huber B***, Sperling J, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O. Rapamycin inhibits extrahepatic tumor growth induced by portal brach ligation. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396: 876-877.

Dold S, Senger S, **Huber B***, Sperling J, Menger MD, Schilling MK, Kollmar O. Inhibition of portal branch ligation-induced extrahepatic tumor growth by rapamycin. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2012; 138(suppl 1): 41.

* Oberkircher, Barbara Maria-Theresia, geborene Huber

9. Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Vielen herzlichen Dank Herrn Prof. Dr. Otto Kollmar für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger für die Hilfestellung und die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Otto Kollmar für die Unterstützung im experimentellen Teil der Arbeit. Allen voran ist hier Dr. Sebastian Senger zu nennen, der mir während der gesamten Zeit bei jedem auftretenden Problem mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank auch Dr. Christian Ziemann, Herrn Stefan Dold und Frau Nadine Schwab.

Bedanken möchte ich mich natürlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie. Im Besonderen bedanke ich mich bei Dr. Claudia Scheuer für die Aufbereitung der Tumorzellen und bei Janine Becker sowie bei Sandra Hans für die Anfertigung der histologischen Schnitte.

Ein großer Dank gilt meinem Ehemann PD Dr. Ludwig Oberkircher, auch ehemaliger Doktorand von Prof. Dr. Kollmar, der immer an mich geglaubt hat und mich unter anderem mit seiner wissenschaftlichen Erfahrung unterstützt hat.

Ein besonderer Dank geht an meine gesamte Familie, vor allem an meine Eltern, die immer hinter mir standen und so mein Studium und diese Dissertation erst möglich gemacht haben.