

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der
Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Der Einfluss der intraperitonealen und intravenösen Applikation von Emodin und
BTB14431 in der konventionellen Chirurgie auf das intra- und extraperitoneale
Tumorstwachstum bei Ratten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jana Pohlenz
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3414

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink
Zweiter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Chris Braumann
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Heike Tönhardt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats, colon cancer, emodin, drug therapy, intravenous injection,
intraperitoneal injection, new drugs

Tag der Promotion: 20.12.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-925-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DAS KOLONKARZINOM	1
1.1.1	INZIDENZ UND PRÄVALENZ	1
1.1.2	ÄTIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE	1
1.1.3	THERAPIEVERFAHREN	3
1.2	MÖGLICHE WIRKORTE ANTINEOPLASTISCHER SUBSTANZEN	4
1.2.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE WACHSTUMSREGULATION EUKARYOTISCHER ZELLEN	4
1.2.2	REGULATION DER ANGIOGENESE	6
1.3	EMODIN UND BTB14431	7
1.3.1	COMPUTERGESTÜTZTES AUSWAHLVERFAHREN DER VERWENDETEN SUBSTANZEN EMODIN UND BTB14431	7
1.3.2	VERGLEICHENDE IN VITRO – TESTS DER VERWENDETEN SUBSTANZEN EMODIN UND BTB14431	8
1.3.3	CHARAKTERISIERUNG VON EMODIN	11
2	<u>ZIELSTELLUNG</u>	15
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	16
3.1	DAS TIERMODELL	16
3.1.1	HERKUNFT DER VERSUCHSTIERE	16
3.1.2	DIE TIERHALTUNG UND DIE TIERPFLEGE	16
3.2	DAS TUMORMODELL	17
3.3	DIE THERAPIELÖSUNGEN	17
3.4	DAS STUDIENDESIGN	18
3.4.1	ÜBERSICHT	18
3.4.2	DOKUMENTATION	18
3.4.3	OPERATIONSMETHODIK UND TUMORIMPLANTATION	19
3.4.4	RANDOMISIERUNG UND THERAPIE	23
3.4.5	BLUTBILD	24
3.4.6	KONTROLLE DES ALLGEMEINBEFINDENS DER TIERE	25
3.4.7	OBDUKTION UND BESTIMMUNG DES TUMORGEWICHTS	25
3.4.8	KONTROLLE DER WUNDHEILUNG	25

3.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	26
4	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>27</u>
4.1	GRUPPENBESETZUNG	27
4.2	TUMORGEWICHT	28
4.2.1	TUMORGEWICHT SUBKUTAN.....	28
4.2.2	TUMORGEWICHT INTRAPERITONEAL	30
4.3	TIERGEWICHT	31
4.4	BLUTBILD	33
4.4.1	LEUKOZYTEN	34
4.4.2	THROMBOZYTEN	34
4.4.3	PERIPHERES VENÖSES BLUTBILD / DIFFERENTIALBLUTBILD.....	35
4.5	UNERWÜNSCHTE WIRKUNGEN.....	37
4.6	TODESFÄLLE	38
4.7	ASZITES UND METASTASEN IM WUNDBEREICH.....	39
4.8	WUNDHEILUNG	40
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>41</u>
5.1	MATERIAL.....	41
5.2	METHODE	43
5.3	BEURTEILUNG DES TUMORWACHSTUMS	43
5.3.1	ANTI-KANZEROGENE WIRKUNG VON EMODIN <i>IN VITRO</i>	44
5.3.2	ANTI-KANZEROGENE WIRKUNG VON EMODIN <i>IN VIVO</i>	47
5.4	TIERGEWICHTSENTWICKLUNG	50
5.5	MORTALITÄT.....	50
5.6	ALLGEMEINE VERTRÄGLICHKEIT VON EMODIN UND BTB14431.....	51
5.7	SCHLUSSFOLGERUNGEN	52
5.8	AUSBLICK.....	52
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>54</u>
7	<u>SUMMARY</u>	<u>56</u>
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>58</u>

9 ANHANG.....	65
9.1 ÜBERSICHT ÜBER IN VITRO STUDIEN - EMODIN INHIBIERT DAS ZELLWACHSTUM.....	65
9.2 ÜBERSICHT ÜBER IN VITRO STUDIEN - EMODIN LÖST APOPTOSE AUS	66
9.3 ÜBERSICHT ÜBER IN VITRO STUDIEN - EMODIN HEMMT METASTASIERUNG	67
9.4 ÜBERSICHT ÜBER IN VIVO STUDIEN MIT EMODIN	68
DANKSAGUNG	69
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	70

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
COP9	constitutive photomorphogenesis 9
CSN	COP9 - Signalosom
5-FU	5-Fluoruracil
BMI	Body Mass Index
BTB14431	9,10-Dihydroxy-1,4-Dihydroanthracene-1,4-Dion
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	endothelial growth factor
ERK	extracellular-signal regulated Kinasen
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
HNPCC	hereditären kolorektalen Karzinom ohne Polyposis (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LOAEL	lowest observed adverse effect level
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOAEL	no observed adverse effect level
PCK2	Proteinkinase CK2
PKD	Proteinkinase D
PVP	Polyvinylpyrrolidon
ROS	reactive oxygen species
Tab.	Tabelle
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 *Das Kolonkarzinom*

1.1.1 Inzidenz und Prävalenz

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Institutes (www.rki.de) wird in Deutschland jährlich bei ca. 71.000 Menschen ein kolorektales Karzinom diagnostiziert. Die Inzidenz ist den Angaben der Deutschen Krebsgesellschaft zufolge steigend. Erkrankten 2002 noch 71.400 Menschen an einem kolorektalen Karzinom, so stieg die Zahl im Jahr 2004 auf 73.250 Neuerkrankungen, wobei Männer genauso häufig wie Frauen betroffen waren. Bei beiden ist das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Krebsart, Männer erkranken noch häufiger an einem Prostatakarzinom, Frauen an einem Mammakarzinom. Das Statistische Bundesamt (www.destatis.de) führt ein Karzinom als die zweithäufigste Todesursache (25,6%) nach Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems (43,4%) im Jahr 2007 an. Das Bronchialkarzinom war dabei die häufigste Karzinomart (41.495 Todesfälle; 5%), gefolgt von kolorektalen Karzinomen (18.072 Todesfälle; 2,2%) und Mammakarzinomen (17.029 Todesfälle; 2,1%). Während 91% der herz- / kreislaufbedingten Todesfälle Personen betraf, die älter als 65 Jahre waren, stellten Tumore der Verdauungsorgane die häufigste Todesursache bei Menschen mittleren Alters dar. Männer waren hierbei etwas häufiger betroffen als Frauen.

1.1.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Als allgemeine Risikofaktoren für eine Kolonkarzinomerkrankung gelten:

- Alter (ab dem 50. Lebensjahr steigend)
- Übergewicht (BMI > 25 kg/m²)
- unregelmäßige bzw. mangelnde körperliche Aktivität
- fettreiche und ballaststoffarme Ernährung
- übermäßiger Alkoholkonsum
- Nikotinkonsum [1, 2].
- Besonders prädisponiert sind jedoch:
- Verwandte ersten Grades von an einem kolorektalen Karzinom oder einem anderen Karzinom Erkrankten
- Menschen mit diagnostiziertem kolorektalen Adenom und deren Verwandte ersten Grades

- Menschen, die an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn leiden
- Menschen, die an einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP) oder an einem hereditären kolorektalen Karzinom ohne Polyposis (HNPCC) leiden und deren Verwandte ersten Grades.

Als FAP wird ein durch autosomal dominante Vererbung bedingtes Auftreten von mehr als 100 kolorektalen Adenomen in Form von Polypen, deren Ausbildung meist in der zweiten Lebensdekade beginnt, bezeichnet [1]. Bei dieser Erkrankung ist der normale Zellzyklus bedingt durch eine Mutation eines Tumorsuppressorgens gestört und es besteht ein nahezu 100%iges Risiko, dass diese Polypen zu kolorektalen Karzinomen entarten. Deshalb wird allein FAP als obligate Präkanzerose bezeichnet. Im Gegensatz zu FAP fehlt bei HNPCC die Ausbildung von Polypen. Bei 80 bis 90 % der Merkmalsträger wird im Mittel im 44. Lebensjahr ein Karzinom ausgebildet, wobei sich in den meisten Fällen ein kolorektales Karzinom entwickelt. Es können aber auch Endometrium-, Ovarial-, Magen-, Dünndarm-, Ureter-, oder Nierenbeckenkarzinome jeweils einzeln oder aber auch als Zweit- oder gar Drittkarzinome auftreten. Es liegt ein Defekt eines DNA-Reparaturenzyms vor, wodurch Basenfehlpaarungen besonders an kurzen DNA-Fragmenten entstehen, die nicht mehr korrigiert werden können [2].

Das kolorektale Karzinom entsteht aus einem gutartigen adenomatösen Polypen der Darmschleimhaut und ist definiert als eine Veränderung, bei der atypische, abnorm proliferierte Kryptenepithelformationen mindestens die Submukosa infiltrieren [3]. Diese Veränderungen resultieren aus einer Kaskade von Genmutationen, die zu einer gestörten DNA-Replikation und letztendlich zu einer gesteigerten Mitoserate führen. Während eine Mutation am *k-ras*-Gen die Replikation fördert, führt eine Mutation am p53-Gen zu genetischer Instabilität dadurch, dass schadhafte DNA nicht mehr repariert werden kann und somit unkorrigiert repliziert wird. Infolgedessen kann es zu einem Verlust der Heterozygotie und damit wiederum zum Verlust von Tumorsuppressorgenen kommen (vgl. Kapitel 1.2.1 Molekularbiologische Wachstumsregulation eukaryotischer Zellen) [4].

Ein häufiges und schwerwiegendes Problem stellt die hämatogene Fernmetastisierung zunächst in die Leber entsprechend dem venösen Abfluss über die Vena portae dar. Meist erst nach dem Auftreten von Lebermetastasen kann es auch zur Ausbildung von Fernmetastasen in Lunge, Peritoneum, Hirn und Nebennieren kommen. Das kolorektale Karzinom metastasiert aber auch auf lymphogenem Wege entlang der Lymphabflusswege an den arteriellen Gefäßen bzw. in regionäre Lymphknoten [1]. Doch auch nach einer chirurgischen Intervention können durch die mechanische Manipulation vereinzelte Tumorzellen im Abdomen zurückbleiben. Diese haben die Potenz zu adhären, zu

emigrieren und sich so zu Rezidivmetastasen zu entwickeln [5]. Der Verlauf und die Prognose der Erkrankung werden vornehmlich durch die Anwesenheit oder das Wiederauftreten von Fernmetastasen (meist Lebermetastasen) bestimmt.

1.1.3 Therapieverfahren

Gemäß der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten hat in der Therapie eines Kolonkarzinoms derzeit ausschließlich eine komplette chirurgische Resektion des Karzinoms, der angrenzenden Lymphknoten (R0-Resektion) sowie eventuell bereits vorhandener Metastasen eine kurative Intention. Auch in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung ist eine operative Intervention angezeigt, z. B. um einen Ileus, eine Tumorperforation oder eine Darmperforation zu verhindern oder (im Notfall) zu beheben. Bei Auftreten eines kolorektalen Karzinoms bei Patienten mit einer FAP, einer HNPCC oder chronisch entzündlichen Darmerkrankung muss meist eine radikale restaurative Proktokolektomie durchgeführt werden. Um den Erfolg der Operation zu sichern und Rezidive durch eventuell verbliebene, makroskopisch nicht sichtbare Tumorzellen zu verhindern wird eine adjuvante Chemotherapie an eine R0-Resektion angeschlossen, sobald regionäre Lymphknotenmetastasen vorliegen (UICC-Stadium III). Bei Vorliegen des UICC-Stadium I (Tumorinfiltration von der Mukosa aus über die Tela submucosa bis maximal in die Tunica muscularis propria) ist eine adjuvante Chemotherapie nicht indiziert. In Stadium II (Tumorinfiltration bis in die Subserosa oder auch darüber hinaus in Nachbarorgane oder das Peritoneum) ist deren Erfolg fraglich und daher in der Regel ebenfalls nicht indiziert, da ein signifikanter Überlebensvorteil in diversen Studien [6-8] nicht nachgewiesen werden konnte. Aktuelle Studien könnten hier jedoch Änderungen der Behandlungsstrategien zur Folge haben. In Risikosituationen wie z. B. Infiltration von Nachbarorganen bzw. Peritoneum, Tumorperforation oder einer Operation unter Notfallbedingungen sollte eine adjuvante Chemotherapie unbedingt erwogen werden.

Zurzeit werden von der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten [2] zur Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie nach Resektion eines Kolonkarzinoms verschiedene sechsmonatige Therapieschemata empfohlen. Sie basieren auf einem Einsatz einer Kombination der Zytostatika 5-Fluoruracil (5-FU), einem Pyrimidinanalogon, und Folinsäure und unterscheiden sich hinsichtlich der Dosierungen, der Applikationszeitpunkte und Applikationsdauer [7, 9, 10]. Ergänzend kann in schwierigeren Fällen Oxaliplatin (FOLFOX-Schema) eingesetzt werden [11]. Eine palliative Chemotherapie ist indiziert, sobald inoperable Metastasen nachgewiesen wurden (UICC-Stadium IV - Fernmetastasen vorhanden), auch wenn diese zunächst symptomfrei

sind. In der First-line-Therapie der palliativen Chemotherapie werden Kombinationschemata bevorzugt eingesetzt, in denen neben 5-FU und Folinsäure entweder Oxaliplatin oder der Topoisomerase-I-Hemmer Irinotecan (FOLFIRI-Schema) angewandt wird. Ergänzend kann dank intensiver Forschung an antiangiogenetisch wirksamen Substanzen der seit 2005 zugelassene monoklonale Antikörper gegen VEGF (vascular endothelial growth factor) Bevacizumab (Avastin®) oder seit Juli 2008 auch der monoklonale Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor Cetuximab (Erbix®) eingesetzt werden. Bei Therapieversagen von Irinotecan kann eine Monotherapie mit Cetuximab (Erbix®) bzw. seit Januar 2008 mit Panitumumab (Vectibix®, ebenfalls monoklonaler Antikörper gegen VEGF-Rezeptor) versucht werden [2].

Die aktuell verwendeten Zytostatika werden von den Patienten vergleichsweise besser vertragen. Bedingt durch den Wirkungsmechanismus der Zytostatika treten aber noch sehr häufig unerwünschte Arzneimittelwirkungen nach Schäden an schnell proliferierenden Geweben (Schleimhäute, Knochenmark, Gonaden, Haut und Hautanhangsgebilde) auf, die zu einer massiven Einschränkung der Lebensqualität betroffener Personen führen. In der Regel ist die Knochenmarksdepression ein dosislimitierender Faktor in der Chemotherapie. Somit ist die Entwicklung potenter Chemotherapeutika mit einem geringeren Ausmaß an unerwünschten Arzneimittelwirkungen ein wichtiges Ziel der Krebsforschung.

1.2 Mögliche Wirkorte antineoplastischer Substanzen

1.2.1 Molekularbiologische Wachstumsregulation eukaryotischer Zellen

Der aus acht Untereinheiten bestehende, 450 kDa große Proteinkomplex des COP9 (constitutive photomorphogenesis 9) - Signalosoms (CSN) stellt im Proteinstoffwechsel der Zelle die Verbindung von Signaltransduktion und ubiquitinabhängiger Proteolyse dar und nimmt somit eine bedeutende Position bei der Wachstumsregulation von Zellen ein [12]. Identifiziert wurde dieser Komplex ursprünglich als ein Gegenspieler der Photomorphogenese, der lichtabhängigen Pflanzenentwicklung, in *Arabidopsis thaliana*-Keimlingen [13]. Es folgten Nachweise von CSN in diversen eukaryotischen Organismen, wie zum Beispiel der Spaltheife (*Saccharomyces cerevisiae*) [14], in *Drosophila melanogaster* [15] und schließlich auch in menschlichen Zellen [16, 17]. Da der CSN-Komplex selbst nicht über eine Kinaseaktivität verfügt, werden Substratphosphorylierungen von assoziierten Kinasen katalysiert [18], so zum Beispiel von der Proteinkinase CK2, die in der gesamten Zelle lokalisiert ist. Es sind mehr als 300 Substrate bekannt, die von der Proteinkinase CK2 (PCK2) phosphoryliert werden, was den Schluss zulässt, dass die PCK2 somit an nahezu allen Zellvorgängen beteiligt ist [19]. Als ein weiteres CSN-assoziiertes Enzym ist die

Proteinkinase D (PKD) bekannt, die im Zytosol von Lymphozyten und an der Plasmamembran vorkommt [20]. Sie beeinflusst zahlreiche zelluläre Funktionen wie die Organisation des Golgiapparates, den gerichteten Transport an der Plasmamembran, die Zellproliferation, Vorgänge der Apoptose und der Immunantwort [21]. Durch die Interaktion mit diesen Kinasen ist das CSN in der Lage, einerseits den Abbau, andererseits die Stabilisierung der Enzymsubstrate zu kontrollieren [22, 23]. Zu den Substraten gehören unter anderem die Transkriptionsregulatoren p53 und c-Jun. Der DNA-bindende Transkriptionsaktivator p53 spielt eine Rolle bei der Überwachung der Stabilität und der Funktionalität des Genoms. Bei über 50% der in der Humanmedizin bekannten Krebsarten konnte ein Zusammenhang mit einer Mutation im p53-codierenden Gen nachgewiesen werden. Infolge dieser Mutation ist p53 nicht mehr in der Lage, an die DNA zu binden. P53 wird auch als Tumorsuppressor bezeichnet. In Zellen, die mit radioaktiven Strahlen oder mit Chemotherapeutika behandelt werden und daraufhin DNA-Schäden entwickeln, wird eine erhöhte p53-Konzentration festgestellt, die letztendlich zu einer Unterbrechung des Zellzyklus in Phase G1 führt. Während dieser Unterbrechung kann die geschädigte DNA repariert werden. Ist die Reparatur nicht erfolgreich, ist p53 am Prozess der Apoptoseeinleitung beteiligt und verhindert somit die Vervielfältigung des geschädigten Genoms bzw. die Proliferation einer möglichen Krebsvorläuferzelle [1, 24]. P53 wird mit hoher Affinität und kontinuierlich an das als eine Art Plattform fungierende CSN gebunden, spezifisch durch die dort ebenfalls gebundene PKD oder PCK2 phosphoryliert und so durch das Ubiquitin/26S-Proteasom abgebaut, weshalb unter physiologischen Zellwachstumsbedingungen nur niedrige p53-Konzentrationen vorliegen. Eine Hemmung des CSN bewirkt die Hemmung der Phosphorylierung und eine Akkumulation von intrazellulärem p53, was zunächst eine Zellzyklusunterbrechung bewirkt. Steigt die Konzentration von p53 weiter an, wird die Zelle gegenüber proapoptotischen Signalen sensibilisiert, woraufhin durch weiter zunehmende p53-Konzentration Apoptose eingeleitet wird. Hingegen kann eine gesteigerte Aktivität des CSN und eine daraus resultierende Senkung der p53-Konzentration unter das physiologische Niveau Tumorwachstum begünstigen [12, 25]. Im Gegensatz zu p53 wird die phosphorylierte Form des Transkriptionsregulators c-Jun gegenüber dem Abbau durch das Ubiquitin/Proteasom-System stabilisiert. c-Jun ist für das normale Zellwachstum und Zelldifferenzierung mitverantwortlich und wird analog zu p53 durch den CSN – Komplex phosphoryliert. Unter physiologischen Bedingungen sind nur sehr niedrige Konzentrationen von c-Jun nachweisbar. Eine erhöhte Konzentration von c-Jun bewirkt also ein vermehrtes Zellwachstum und verstärkte Proliferation. Ein vermehrter Abbau von c-Jun, zum Beispiel durch Hemmung des CSN, hingegen resultiert in Apoptose [26]. Die Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun konkurrieren um die Bindungsstelle am CSN und können sich so gegenseitig hemmen. Sie beeinflussen auch die intrazelluläre Konzentration von VEGF. Eine vermehrte

Produktion von VEGF resultiert aus einer übermäßigen Aktivität des CSN, die einen erhöhten c-Jun-Spiegel und einen verminderten p53-Spiegel verursacht. Eine Inhibition des CSN, und damit der Substratphosphorylierung, verschiebt das Gleichgewicht nun zugunsten von p53, da dieses stabilisiert und c-Jun forciert abgebaut wird, wodurch wiederum die VEGF-Synthese absinkt [27]. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl p53 als auch c-Jun wichtige zelluläre Funktionen wie die Regulation der Transkription, Reparatur der DNA, Zellzyklusregulation und Apoptose kontrollieren und indirekt über VEGF Angiogenese beeinflussen.

Das durch das CSN und das Ubiquitin/Proteasom-System kontrollierte intrazelluläre Verhältnis von p53 und c-Jun ist in vielen Tumorzellen gestört und damit anscheinend ausschlaggebend für eine Tumorentwicklung. Eine Mutation im p53-Gen ist einer der am häufigsten festgestellten Defekte im Verlauf von Tumorentstehung und Tumorwachstum [28, 29]. Sie führt zum Verlust der Kontrolle über das Zellwachstum und zur Aufhebung des programmierten Zelltodes [30]. Sogar zwei Drittel der kolorektalen Karzinome weisen diese Mutation auf [31], was die klinische Prognose oft verschlechtert [28]. Zudem können Veränderungen am CSN selbst Tumorwachstum begünstigen indem dann die zwei bedeutenden intrazellulären Prozesse der Signaltransduktion und des Proteinabbaus, verbunden durch das CSN, gestört sind [22]. Bereits 1999 konnte *in vitro* der Einfluss der CSN-vermittelten Phosphorylierungen von p53 und c-Jun auf die p53-abhängige Apoptose in Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden [32].

1.2.2 Regulation der Angiogenese

Die Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden, ist von essentieller Bedeutung für aggressives Tumorwachstum und Metastasierung. In der prävasculären Phase des Tumorwachstums ist die Tumorzellansammlung nicht größer als 2-3mm³ und enthält eine Million oder mehr Zellen. Wächst der Tumor weiter, ist er aufgrund der dann unzureichenden Versorgung vor allem mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusion aus umliegendem Gewebe auf die Ausbildung eines eigenen Blutgefäßsystems angewiesen [33, 34]. Eine wichtige Rolle im komplexen Prozess der Angiogenese spielen Wachstumsfaktoren wie der vascular endothelial growth factor (VEGF), der fibroblast growth factor (FGF), der platelet-derived growth factor (PDGF) oder der transforming growth factor β (TGF- β), deren Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, darunter c-Jun und p53, kontrolliert wird [34-36]. Der potenteste Wachstumsfaktor ist VEGF [37], von dem insgesamt fünf verschiedene Isoformen vorkommen. Diese unterscheiden sich in der Anzahl der Aminosäuren (121 bis 206) und werden durch alternatives Splicing ausgehend von einem einzigen Gen gebildet [38]. VEGF, in diesem Fall von Tumorgewebe abgegeben,

bindet an Membranrezeptoren von Endothelzellen, was zu einer Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität führt. Die aktivierten Endothelzellen können aus der Kapillare in das Interstitium emigrieren nachdem die Basalmembran und das die Kapillare umgebende Bindegewebe durch Proteinasen lysiert wurden. Die einzelnen Zellen beginnen in Richtung des angiogenen Stimulus zu proliferieren, lagern sich kreisförmig zusammen und verbinden sich dann mit weiteren zirkulär angeordneten Endothelzellverbänden, um schließlich umhüllt von einer neu gebildeten Basalmembran und Perizyten ein neues Blutgefäß zu formieren [34, 36].

Es gibt Tumore, die mikroskopisch klein bleiben, also kein eigenes Gefäßnetz benötigen und so asymptomatisch und meist auch unentdeckt bleiben. Wodurch ein so genannter angiogenetischer Switch ausgelöst wird, der zu Wachstum und Gefäßbildung führt, ist derzeit nicht genau bekannt. Man vermutet, dass dafür ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Regulatoren infolge genetischer Instabilität verantwortlich ist [35]. Das physiologische Gleichgewicht dieser Regulatoren ist dafür verantwortlich, dass im adulten Organismus nur wenig neue Gefäße gebildet werden. Ausnahmen davon stellen Wundheilung, Follikelreifung mit anschließender Ausbildung eines Corpus luteum und Embryonalentwicklung dar. Eine pathologisch gesteigerte Angiogenese ist nicht nur im Rahmen von Tumorwachstum, sondern auch bei anderen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Psoriasis, seniler Makuladegeneration und diabetischer Retinopathie zu beobachten [36].

1.3 Emodin und BTB14431

1.3.1 Computergestütztes Auswahlverfahren der verwendeten Substanzen Emodin und BTB14431

Mit dem Ziel, neue und noch effektivere Inhibitoren des CSN-Komplexes zu finden, wurde von Füllbeck et al. [39] die Methode des *in silico* Screenings weiterentwickelt und durchgeführt. Mit dieser erweiterten Methode sollen Stoffe gefunden werden, die strukturell und chemisch mit einer Leitsubstanz verwandt sind. Für das *in silico* Screening wurde eine hauseigene Datenbank der Charité genutzt, die zurzeit mehr als vier Millionen Substanzen teils unbekannter biologischer Relevanz bzw. Aktivität beinhaltet. Zunächst wurden dabei in einer dreidimensionalen (3D) Suche strukturell ähnliche Substanzen identifiziert. Nach einer anschließenden zweidimensionalen (2D) Suche mussten die Substanzen hinsichtlich ihrer chemischen Eigenschaften Ähnlichkeiten mit der Leitsubstanz aufweisen. Um als potentiell Arzneimittel in Frage zu kommen, muss eine Substanz noch über weitere spezielle Eigenschaften verfügen. So darf sie nicht toxisch wirken, muss vom Organismus absorbiert

werden können und fähig sein, Membranen zu passieren. Dafür wurde ein bestimmter Eigenschaftsfilter benutzt: Lipinski's rule-of-five [40]. Demnach darf eine Substanz, die als Arzneimittel verwendet werden soll, weniger als zehn H-Bindungs-Akzeptoren und weniger als fünf H-Bindungs-Donatoren aufweisen. Der berechnete logP-Wert, der die Lipophilie beschreibt, sollte kleiner als fünf sein und das Molekulargewicht sollte 500 g/mol nicht überschreiten. Wird mehr als eines dieser Kriterien nicht erfüllt, ist die Substanz als potenzielles Arzneimittel ungeeignet.

Das *in silico* Screening wurde anhand der Leitsubstanzen Curcumin und Emodin durchgeführt. Emodin wird bereits in zahlreichen experimentellen Untersuchungen eingesetzt und ist bekannt als Inhibitor der Proteinkinase CK2, der PKD und des CSN-Komplexes [18]. Eine anhand der Leitsubstanz Emodin gefundene Substanz ist 9,10-dihydroxy-1,4-dihydroanthracene-1,4-dion (im Folgenden als BTB14431 bezeichnet).

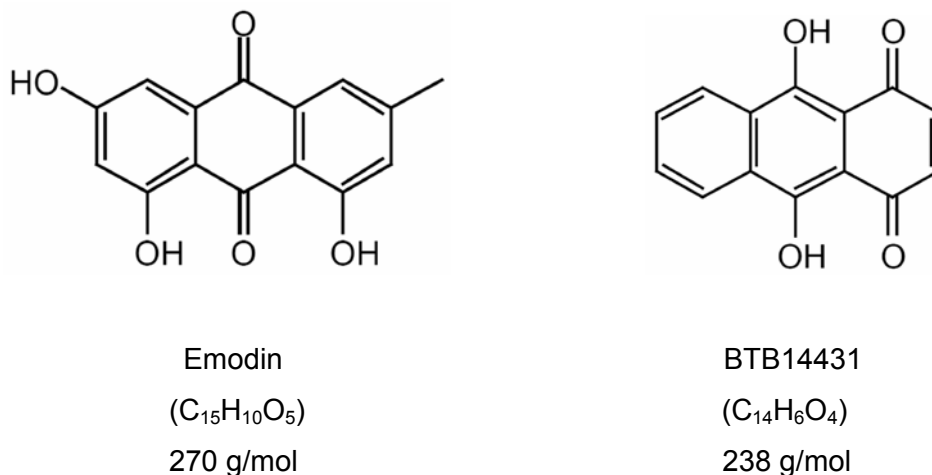


Abbildung 1: Die Anthrachinone Emodin und BTB14431 Abgebildet sind die Strukturformeln, in Klammern die Summenformeln und darunter das jeweilige Molekulargewicht.

1.3.2 Vergleichende *in vitro* – Tests der verwendeten Substanzen Emodin und BTB14431

Im Anschluss an das *in silico* Screening wurde BTB14431 vergleichend mit Emodin *in vitro* mittels Kinase-Assays und Zellkulturen analysiert [39]. Die Ergebnisse zeigten, dass BTB14431 die COP9-assoziierten Proteinkinasen PKD und PCK2 gehemmt wurden und dadurch in den Tumorzellen B8 (Fibroblasten der Maus) und HeLa (humanes Cervixkarzinom) die intrazelluläre Konzentration von p53 stieg. Dies führte zu

Tumorsuppression durch Auslösung von Apoptose. Gleichzeitig fiel die intrazelluläre Konzentration von c-Jun ab, wodurch auch weniger VEGF produziert und die Angiogenese gehemmt wurde. In zusätzlich durchgeführten Apoptose-Assays konnte eine DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden. Die anschließende Annexin-Färbung bestätigte, dass der ausgelöste Zelltod einen Apoptose-Phänotyp und keinen Nekrose-Phänotyp aufwies. Eine mitochondriale Vitalitätsmessung der Zellen (MTT-Test) zeigte, dass die Zellvitalität nach Zugabe von BTB14431 um bis zu 80% abnahm. Des Weiteren wurden unter Verwendung von Kinase-Essays CSN, PKD bzw. PCK2 mit einer definierten Menge c-Jun versetzt und BTB14431 in steigenden Konzentrationen für eine Stunde zugegeben. Ausgehend von einer 100%igen Aktivität des CSN und der Proteinkinasen ohne Zugabe von BTB14431 wurden die jeweiligen Aktivitäten nach Zugabe von BTB14431 bestimmt (Tabelle 1). Das Ergebnis zeigte deutlich, dass BTB14431 ein spezifischer Inhibitor der PCK2 ist, auch das CSN gut zu hemmen vermag, die PKD aber nur unspezifisch bzw. erst in hohen Konzentrationen hemmt.

Konzentration BTB14431	20 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
Aktivität CSN [%]	56	26	17	11
Aktivität PKD [%]	87	80	32	18
Aktivität PCK2 [%]	20	15	9	4

Tabelle 1: Aktivitätssenkungen von CSN und seiner assoziierten Proteinkinasen PKD und PCK2 nach Zugabe von BTB14431 in steigenden Konzentrationen. BTB14431 kann bereits in einer Konzentration von 20 μ M die Aktivität von PCK2 signifikant senken.

Die aus den Inhibitorkonzentrationen und den verschiedenen Aktivitäten abgeleiteten Kurven dienen zur Ermittlung der jeweiligen Inhibitionskonstanten IC_{50} von BTB14431. Diese wurden mit den bereits bekannten IC_{50} -Werten von Emodin [18] verglichen (Tabelle 2). Die Inhibitionskonstante gibt die Konzentration eines Stoffes an, bei der die Hälfte der maximal möglichen Hemmung erreicht ist, das heißt bei dieser Konzentration ist der Stoff an 50% des vorhandenen Enzyms gebunden und dieses damit zu 50% inhibiert. Im Ergebnis konnte festgestellt werden, dass Emodin und BTB14431 spezifische Inhibitoren von CSN selbst (Emodin besser als BTB14431) und seiner assoziierten Proteinkinase CK2 (BTB14431 besser als Emodin) sind. Die PKD wird von beiden eher unspezifisch gehemmt.

	Emodin	BTB14431
IC ₅₀ CSN	4,4 µM	21,0 µM
IC ₅₀ PKD	94,5 µM	68,9 µM
IC ₅₀ PCK2	22,7 µM	6,4 µM

Tabelle 2: Inhibitionskonstanten von Emodin und BTB14431 wurden ermittelt für das CSN selbst und dessen assoziierte Proteinkinasen PKD und PCK2. Emodin ist ein spezifischer Inhibitor des CSN, BTB14431 ein spezifischer Inhibitor der PCK2.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass BTB14431 ebenso wie Emodin durch ihre Eigenschaft, den CSN-Komplex und seine assoziierten Proteinkinasen effektiv zu hemmen, indirekt die Fähigkeit besitzen, den c-Jun-Spiegel in Tumorzellen zu senken und den p53-Spiegel zu erhöhen. Die so stimulierte Apoptose und die unter diesen Bedingungen sinkende VEGF-Konzentration stellen zwei wichtige Voraussetzungen für eine antineoplastische Wirkung von Emodin und BTB14431 dar.

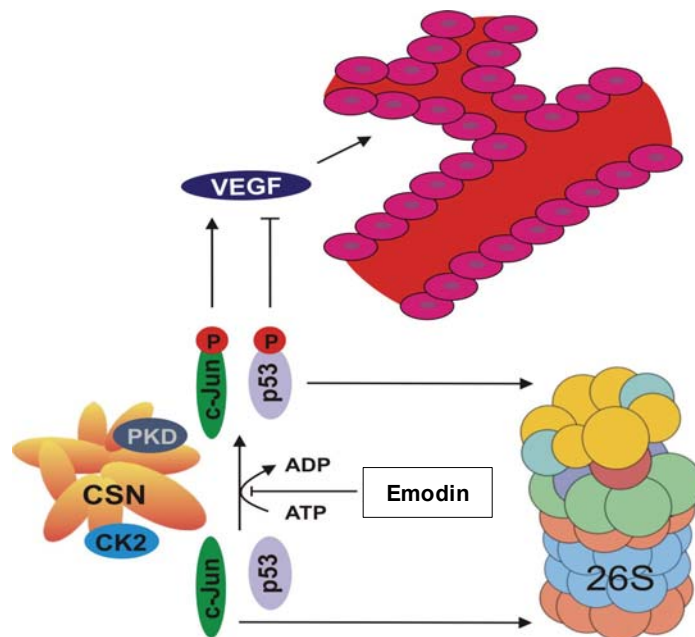


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Regulation von Zellwachstum und Angiogenese durch Emodin. Die Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun werden durch die CSN-assoziierten Proteinkinasen PKD und CK phosphoryliert und dadurch beschleunigt über das 26S-Proteasom (26S) abgebaut (p53) bzw. stabilisiert (c-Jun). Phosphoryliertes p53 hemmt die Expression von VEGF, wohingegen phosphoryliertes c-Jun selbige steigert. Emodin bewirkt nun eine Stabilisierung von p53, einen erhöhten Abbau von c-Jun und daraus resultierend eine verminderte Expression von VEGF. (modifiziert nach Berse [41])

1.3.3 Charakterisierung von Emodin

Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinon) gehört zur Gruppe der Anthrachinone, unter der Derivate der Grundsubstanz Anthracen zusammengefasst sind. Anthracen ist ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff mit der Summenformel $C_{14}H_{10}$ und besteht damit aus drei aromatischen Ringsystemen.

Emodin ist natürlicher sekundärer Inhaltsstoff von Wurzeln, Rinde oder Blättern zahlreicher Pflanzen. Einige der bekanntesten davon sind verschiedene Faulbaumarten (*Frangula ssp.*), Kreuzdorn (*Rhamnus ssp.*), Senna (*Senna alexandrina*), Aloe *ssp.*, vor allem aber die Knöterichgewächse (*Polygonaceae*) Chinesischer Rhabarber (*Rheum officinale*) und Japanischer Staudenknöterich (*Polygonum cuspidatum*). Nach einer Verwendung als Heilmittel in der traditionellen chinesischen Pflanzenmedizin sind Extrakte dieser Pflanzen bis in die heutige Zeit Bestandteile von Laxativa [42-44].

Toxikologische und mutagene Effekte

Bei chronischem Missbrauch anthrachinonhaltiger Laxativa besteht der Verdacht eines erhöhten Risikos, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken [45]. Aufgrund der planaren chemischen Struktur von Emodin wurde bereits 1966 dessen Fähigkeit zur Interaktion mit der DNA postuliert [46]. Ein genotoxisches, kanzerogenes Potential von Emodin wurde angenommen [47] und nachgewiesen [48]. So führte eine Inkubation mit Emodin von Lymphomzellen L5178Y der Maus zu einer Inhibition der Topoisomerase II und zu gehäufert nicht kovalenter DNA-Bindung mit dem Resultat chromosomaler Läsionen [48, 49]. Das mutagene Potential von Emodin konnte auch in einem TA 1537-Salmonellastamm bestätigt werden. Hier wurde der 6-Methylgruppe des Emodinmoleküls eine zentrale Bedeutung zugewiesen, da diese durch eine Metabolisierung durch Leberenzyme weder verändert, noch eliminiert wurde [50, 51]. Aber auch die beiden Hydroxylgruppen an Position eins und drei wurden als Ursache für die mutagene Wirkung von Emodin in V79-HGPRT-Hamsterfibroblasten identifiziert [51].

Müller et al. vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte in Berlin bezeichneten 1995 bestimmte Hydroxyanthracenderivate, darunter Emodin, als wertvolle Alternative zu synthetischen Laxativa. Jedoch empfahlen sie aufgrund unzureichender Mutagenitäts- und Kanzerogenitätsstudien eine Einnahme über einen Zeitraum von maximal zwei Wochen nur nach strenger Indikationsstellung einer Obstipation, nicht bei Kindern unter einem Alter von zwölf Jahren und nicht während der Schwangerschaft und der Stillzeit [47]. Grundlage für diese Empfehlung waren Studien, die einen Zusammenhang zwischen längerfristiger Einnahme von Anthrachinonen in Laxativa, darunter Emodin, und kolorektalen Tumoren bei Ratten [52] und auch Menschen [53] nachweisen konnten.

In den USA wurde 2001 vom National Toxicology Program (NTP) eine Langzeitfütterungsstudie über die Toxizität und Kanzerogenität von Emodin abgeschlossen [42]. F344/N - Ratten wurden verschiedene Tagesdosierungen von bis zu 3700 mg/kg KG Emodin an 16 Tagen, bis zu 300 mg/kg KG über 16 Wochen (Toxizität) und bis zu 1100 mg/kg KG über zwei Jahre oral verabreicht (Kanzerogenität). B6C3F1 - Mäusen wurden verschiedene Tagesdosierungen von bis zu 5000 mg/kg KG Emodin an 16 Tagen, bis zu 1100 mg/kg KG über 16 Wochen und bis zu 120 mg/kg KG über zwei Jahre mit dem Futter verabreicht. Es konnte kein Tumorwachstum bei männlichen Ratten beobachtet werden. Bei einigen weiblichen Ratten ergab sich ein unspezifischer Hinweis auf kanzerogene Aktivität in der Art, als dass eine erhöhte Inzidenz eines Karzinoms der Zymbaldrüse (modifizierte, den Ohrgrund umschließende Talgdrüse, die in den äußeren Gehörgang mündet) auftrat. Bei männlichen Mäusen konnte eine geringe Inzidenz von ungewöhnlichen Neoplasien der Nierentubuli nachgewiesen werden. Abschließend musste konstatiert werden, dass Hinweise auf kanzerogene Aktivität bei weiblichen Ratten und männlichen Mäusen zweifelhaft waren und bei männlichen Ratten und weiblichen Mäusen nicht gefunden werden konnten. Die Emodinexposition resultierte jedoch auch in einer erhöhten Inzidenz von Nierenveränderungen allgemein, wie Hyalinablagerungen und Pigmentierungen im Bereich der renalen Tubuli und Nephropathie. Ein Jahr später (2002) wurden vom NTP Studien über die Teratogenität von Emodin abgeschlossen, in denen Ratten vom sechsten bis zum zwanzigsten Tag der Gestation wiederum verschiedene Dosierungen von Emodin mit dem Futter verabreicht wurden. Bis zu einer Tagesdosis von 57 mg/kg konnten keine nachteiligen Effekte beobachtet werden (NOAEL). Ab einer Tagesdosis von über 80 mg/kg wurden Körpergewichtsabnahmen bei Muttertier und Fetus registriert (LOAEL), bei keiner Dosierung traten stärkere Beeinträchtigungen oder fetale Malformationen auf. Eine in identischer Weise durchgeführte Studie bestätigte diese Ergebnisse. Es konnte auch hier kein Einfluss von Emodin auf die pränatale Mortalität, die Wurfgröße, das fetale Geschlechterverhältnis und die morphologische Entwicklung von Ratten gezeigt werden [54]. Allgemeine Toxizitäts- oder Mutagenitätsstudien, in denen Emodin parenteral verabreicht wurde, sind derzeit nicht verfügbar.

Im Gegensatz zu *in vitro* Studien an Krebszellen (vgl. Kapitel 5.3.1 Antikanzerogene Wirkung von Emodin *in vitro*) konnten bei *in vitro* Studien an normalen Zellen wie an physiologischen humanen HBL-100 Brustgewebezellen [55] und humanen Bronchialepithelzellen [56] keine zytotoxischen Effekte beobachtet werden. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass normale Zellen resistenter gegenüber den Wirkungen von Emodin sind als Tumorzellen. Diese Spezifität von Emodin könnte darauf zurückzuführen sein, dass die emodinbedingten Effekte auf einem Eingriff in Signaltransduktionswege von Onkogenen beruhen, die in tumorös entarteten Zellen aktiver oder zumindest verändert ablaufen.

Molekulare Mechanismen antikanzerogener Effekte

Emodin ist ein bekannter kompetitiver Hemmer der CSN-assoziierten Kinasen PKD und PCK2 [18, 22]. Es konnte eine stärkere Affinität von Emodin zur PCK2 verglichen mit der zur PKD festgestellt werden [39, 57]. Emodin bindet dabei an das aktive Zentrum der PCK2 und blockiert die ATP-Bindungsstelle in unmittelbarer Nähe zur Substratbindungsstelle. Dies führt zu einer kompetitiven Inhibition der Bindung der natürlichen Kosubstrate [58]. Es wird vermutet, dass die Hydroxylgruppe an Position drei bei der Bindung von Emodin an die PCK2 eine bedeutende Rolle spielt, da Emodinanaloga ohne diese Hydroxylgruppe die Kinase nicht zu hemmen vermögen [59].

Durch die Inhibition der Proteinkinasen PKD und PCK2 wird, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, das Tumorsuppressorgen p53 stabilisiert, das eine wichtige Rolle in den Prozessen der Zellzyklusunterbrechung in Phase G1 nach DNA-Schädigung und der Apoptose einnimmt. Viele Tumoren umgehen diese Effekte mit einer Mutation im p53-Gen. Durch die Kinaseinhibition wird der Transkriptionsregulator c-Jun, der Zellwachstum und –proliferation positiv beeinflusst, vermehrt abgebaut. Beide genannten Effekte resultieren in einer Unterdrückung von Proliferation und Angiogenese und letztendlich in Apoptose [18, 22]. Zudem induziert eine Akkumulation von p53 die verstärkte Expression von p21, ein weiteres Tumorsuppressorgen, das ebenso wie p53 eine Zellzyklusunterbrechung hervorruft [60].

Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls eine emodininduzierte Apoptose beobachten. Jedoch wurde diese hier auf die Ausbildung und Wirkung von sogenannten Reactive Oxygen Species (ROS) des semichinoiden Emodinmoleküls zurückgeführt [60-65]. Chinone verfügen über eine hohe Redoxaktivität und ihre Semichinonradikale ermöglichen in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff die Bildung von ROS wie Superoxidanionradikale, Hydrogenperoxide und Hydroxylradikale [66-68]. Diese Radikale können das Membranpotential der Mitochondrien bis hin zu dessen Kollaps verändern. Es erfolgt eine Freisetzung von Cytochrom c aus den beschädigten Mitochondrien, die Aktivierung der Caspasen 3 und 9 und die Einleitung von Apoptose [69].

Des Weiteren konnte ein hemmender Einfluss von Emodin auf die Auto- und Transphosphorylierungsaktivitäten von p185neu, eine auf Wachstumsfaktoren reagierende transmembrane Tyrosinkinase, gezeigt werden. Die Erhöhung dieser p185neu-Aktivität fördert die Tumorentstehung, ihre Hemmung hingegen zu Unterdrückung von Zelltransformation und Tumorwachstum [55, 70]. Zusätzlich wurde eine erhöhte p185neu-Aktivität mit einer Chemoresistenzentwicklung von Tumorzellen in Verbindung gebracht. Deren Hemmung konnte eine Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Zytostatika wie Cisplatin und Doxorubicin *in vitro* [70] und *in vivo* [71] hervorrufen. Der Vergleich dieser Effekte und der chemischen Struktur von Emodin mit denen anderer Anthrachinonderivate

zeigte, dass mindestens je eine Methyl-, eine Hydroxyl- und eine Carbonylgruppe für das Auftreten dieser Effekte von essentieller Bedeutung sind [71]. Eine andere Arbeitsgruppe, die einen ähnlichen Vergleich untersuchte, vermutete, dass für die Wachstumshemmende Wirkung von Anthrachinonderivaten wie Emodin mindestens zwei Hydroxylgruppen vorhanden sein müssen [72].

In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass Emodin auch als Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ B fungiert, indem es den Abbau der inhibitorischen Untereinheit I κ B α verhindert [69]. Der durch aktiviertes NF- κ B ausgelöste Signaltransduktionsweg spielt eine bedeutende Rolle bei der Tumorgenese, da aktiviertes NF- κ B Apoptose unterdrückt [73] und beispielsweise die pro-angiogenen Faktoren COX-2 (Cyclooxygenase 2) und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) induziert [74].

2 Zielstellung

Das Ziel dieses Tierexperiments war die Untersuchung der Effekte der Substanzen Emodin und BTB14431 auf das Wachstum von Kolonkarzinomen (Kolonadenokarzinomzellen CC-531). In einem validierten Rattenmodell (WAG/Rij - Ratten) wurden die Tumorzellen mittels einer Suspension implantiert. Es sollten sowohl die Applikationsform (Emodin oder BTB14431 intraperitoneal versus systemisch) als auch der Wirkungsort (lokales intraperitoneales Wachstum versus subkutane Fernmetastasen) analysiert werden. Da für BTB14431 keine *in vivo* - Studien existieren, musste anhand dieses Tierexperiments gleichzeitig eine Dosisfindung erfolgen sowie eine eventuell toxikologische Wirkung abgeklärt werden.

Konkret ergaben sich folgende Fragestellungen:

Welchen Einfluss haben Dosissteigerungen von Emodin und BTB14431 auf das intra- und extraperitoneale Tumorstadium der Ratte nach Laparotomie?

Gibt es einen Unterschied des Tumorgewichtes nach intravenöser und intraperitonealer Therapie?

Welche intraperitonealen bzw. intravenösen Dosen von Emodin oder BTB14431 führen zu welchen unerwünschten Wirkungen bei der WAG/Rij - Ratte?

3 Material und Methoden

3.1 *Das Tiermodell*

3.1.1 Herkunft der Versuchstiere

Es wurde ein anerkanntes Tiermodell für Metastasen des kolorektalen Karzinoms des Menschen verwendet. Das Tierexperiment wurde mit insgesamt 120 männlichen WAG/Rij – Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. WAG ist die Abkürzung für Wistar Albino Glaxo, Rij steht für den niederländischen Ort Rijswijk, in dessen Tierlaboratorien der Stamm weiterentwickelt wurde. Entwickelt wurde dieser Rattenstamm ursprünglich 1924 von BACHARACH aus einem Wistar-Stamm in den Glaxo-Laboratorien für Tierversuche in Großbritannien (CHARLES RIVER LABORATORIES, 1997). Bei Aufnahme zu Versuchsbeginn waren die Tiere ca. neun Wochen alt und ihr Körpergewicht betrug 200 bis 250 g.

3.1.2 Die Tierhaltung und die Tierpflege

Die Tierhaltung erfolgte entsprechend den Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Die Versuchstiere wurden in einem eigens für Nagerhaltung vorgesehenen, klimatisierten Raum bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 – 60%, einer Raumtemperatur von 22 - 24°C und einem Tag- / Nachtzyklus von je 12 Stunden untergebracht. Die einzelnen Standardlaborkäfige wurden mit entstaubter Holzgranulateinstreu und Versteckmöglichkeiten aus Pappe bestückt und mit jeweils vier oder fünf Tieren besetzt. Bei freiem Zugang zu Trinkwasser stand den Tieren ein Standardlaborfutter in Pelletform ad libitum zur Verfügung. Zwischen der Aufnahme und der ersten Intervention wurde den Tieren eine Akklimatisationsphase von sieben Tagen gewährt, um sich an die neue Umgebung und ihre Artgenossen zu gewöhnen. Die Tiere wurden täglich von speziell geschultem Fachpersonal versorgt, gepflegt und kontrolliert. Die bereits jahrelange Erfahrung der Arbeitsgruppe in der Arbeit mit diesem Tier- und auch Tumormodell ermöglichte eine routinierte und standardisierte Durchführung des Tierversuchs.

Das Tierexperiment wurde unter der Genehmigungsnummer G0192/06 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin bewilligt und durchgeführt im Tierversuchslabor der Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

3.2 Das Tumormodell

Als Tumormodell wurden syngenetische Kolonadenokarzinomzellen (CC-531; DKFZ, Heidelberg, Deutschland) der WAG/Rij – Ratte verwendet. Diese Zellen wurden in Dulbeccos MEM (Biochrom, Deutschland) und HAMs F10-Medium (Biochrom, Deutschland) 1:1 mit 10%igem fetalen Rinderserum (Dibco BRL, Deutschland), 2 mmol/l Glutamin (Biochrom, Deutschland) und Penicillin-Streptomycin 1000 IU/ml (Gibco, Deutschland) kultiviert.

Um die gewünschte Tumorzellkonzentration zu erreichen, wurde die Zellkultur nach Absaugen des Mediums unter Zugabe von 4 ml Trypsin fünf Minuten in angefeuchteter Atmosphäre mit einem CO₂ – Gehalt von 5% bei 37°C im Inkubator passagiert. Um die Trypsinwirkung zu beenden, wurden danach 10 ml Vollmedium zugegeben, die Lösung gut suspendiert und bei 1100 U/min zehn Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde wiederum mit 10 ml frischem Vollmedium versetzt und resuspendiert. Die Anzahl der Zellen wurde durch deren Auszählung unter dem Mikroskop in der Neubauer-Zählkammer unter Verwendung der Tryptan-Blau-Methode bestimmt, wobei 0,1 µl einer Lösung, die zu gleichen Anteilen aus Tryptan-Blau und Zellsuspension bestand, in die Zählkammer gegeben wurde. Diese Methode ermöglichte gleichzeitig eine Einschätzung der Rate avitaler Zellen. Entsprechend der Zellzahl erfolgte die für die gewünschte Konzentration erforderliche Verdünnung mit Medium, dieses nun ohne Zusatz von fetalem Rinderserum, um Reaktionen auf Fremdanigene zu vermeiden. Die fertige Zellsuspension wurde in Eppendorfgefäße portioniert, im Inkubator bis zur endgültigen Verwendung aufbewahrt und unmittelbar vor der Applikation gut geschwenkt, um abgesunkene Tumorzellen zu resuspendieren.

3.3 Die Therapielösungen

Die pulverförmigen Rohstoffe von Emodin (ACROS Organics, Geel, Belgien) und BTB14431 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurden jeweils am Tag vor der ersten Anwendung unter sterilen Bedingungen zu Lösungen, die den Kriterien für intravenös anwendbare Injektionslösungen entsprechen mussten (vgl. Kapitel 5.2 Methode), verarbeitet.

Zunächst wurde eine 5%ige Lösung aus Polyvinylpyrrolidon (PVP, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), das als Lösungsmittel diente, und steriler Natriumchloridlösung 0,9% (Braun, Deutschland) hergestellt. Diese PVP-Lösung wurde zu dem je nach Bedarf abgewogenen (Waage: BP310S Sartorius AG, Göttingen) Pulver von Emodin bzw. BTB14431 gegeben und beides in einem Rüttler (MS1 Minishaker, IKA Works Inc.) bei 2000 U/min zwei Minuten lang vermischt.

Um eine bestmögliche Lösung zu erreichen, wurde die Suspension für 20 Minuten einem auf 40°C vorgeheiztes Ultraschallbad (Sonorex, Bandelin electronic, Berlin) unterzogen.

3.4 Das Studiendesign

3.4.1 Übersicht

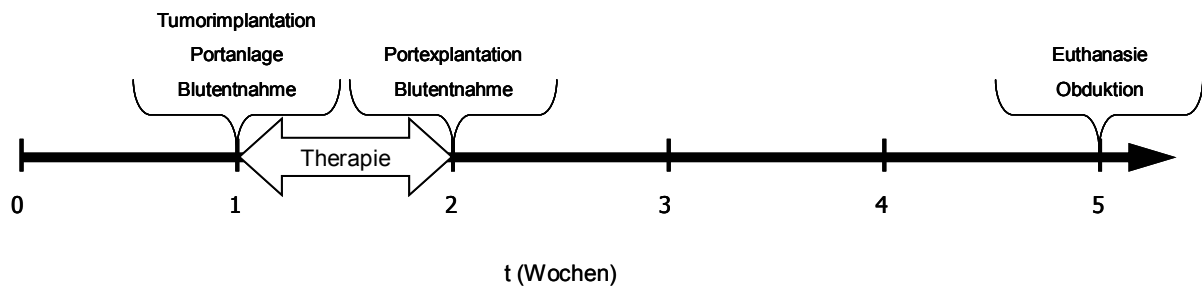


Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf des Tierexperiments

Die Anlieferung der Tiere erfolgte jeweils sieben Tage vor der ersten Intervention. In diesem Zeitraum konnten sich die Tiere vom Transportstress erholen und an ihre neue Umgebung gewöhnen. Nach diesen sieben Tagen erfolgte unter einer gewichtsbezogenen Allgemeinanästhesie die Kennzeichnung der Tiere, eine Blutentnahme, eine Laparotomieoperation, die Tumorzellapplikation, gegebenenfalls eine Portimplantation als Möglichkeit eines venösen Zugangs und die erste Therapiegabe. Die Therapie wurde insgesamt sieben Tage, also bis einschließlich Tag sechs post operationem, durchgeführt. Am Tag zwei post operationem wurde eine zweite Blutprobe entnommen. Am Tag sieben post operationem wurde, soweit vorhanden, der intravenöse Port wiederum unter gewichtsbezogener Allgemeinanästhesie entfernt. Weitere 21 Tage nach der Beendigung der Therapie, bzw. 28 Tage nach der Tumorzellapplikation wurden die Tiere euthanasiert und obduziert.

3.4.2 Dokumentation

Jedes Tier erhielt unmittelbar vor der ersten Operation eine nummernkodierte Kennzeichnung durch eine Lochstanze im Bereich des Ohrmuschelrandes. Für jedes Tier wurden auf speziellen Bögen das Einstellungsdatum, das Körpergewicht zu verschiedenen Zeitpunkten, die jeweilige Therapiegruppe, eventuelle Besonderheiten, die Zeitpunkte und die Art der jeweiligen Eingriffe und die Ergebnisse der Obduktion erfasst.

3.4.3 Operationsmethodik und Tumorimplantation

Zunächst wurde jedes Tier gewogen (Sartorius BL12, Sartorius-AG) und randomisiert. Danach erfolgte die intramuskuläre Injektion einer körpergewichtsabhängigen Kombination von Xylazin (12 mg/kg KG, Rompun®, Bayer-AG, Leverkusen) und Ketamin (75 mg/kg KG, Ketanest®, Pfizer, Berlin).

Mediane Laparotomie

Um ein Auskühlen der Tiere zu vermeiden, wurden die Operationen auf einer steril abgedeckten Heizmatte durchgeführt.

Das Operationsfeld wurde großzügig und gründlich vom Rippenbogen bis zum knöchernen Becken enthaart (Rasur) und danach mit einer jodhaltigen Lösung (Braunol®, Braun, Melsungen) desinfiziert. Nun erfolgte eine circa 4 cm lange mediane Inzision der Haut und eine ähnlich lange Eröffnung der Bauchhöhle in der Linea alba. Um den Operationsstress eines größeren Eingriffs zu simulieren, wurde das Coecum eventeriert und zur Antrocknung der intestinalen Serosa auf einer sterilen Kompresse gelagert. Nach zehn Minuten wurde das Coecum reponiert und die Suspension von 100.000 Kolonadenokarzinomzellen (CC-531) dort appliziert. Den Tieren, die eine intraperitoneale Therapie erhalten sollten, wurde anschließend die Therapielösung auf gleiche Weise verabreicht. Nun wurde die Bauchdecke in zwei Schichten verschlossen. Sowohl die Muskelnahat als auch die Hautnahat erfolgte fortlaufend mit einer Vicrylnahat (Vicryl®, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) der Stärke 4/0. Das Wundgebiet wurde erneut mit Jodlösung desinfiziert und zusätzlich mit einem Sprühverband geschützt, um Wundinfektionen zu vermeiden.

Um eine extraperitoneale Metastasierung zu simulieren, wurden jedem Tier ebenfalls 100.000 Kolonadenokarzinomzellen subkutan in die Nackenfalte appliziert.

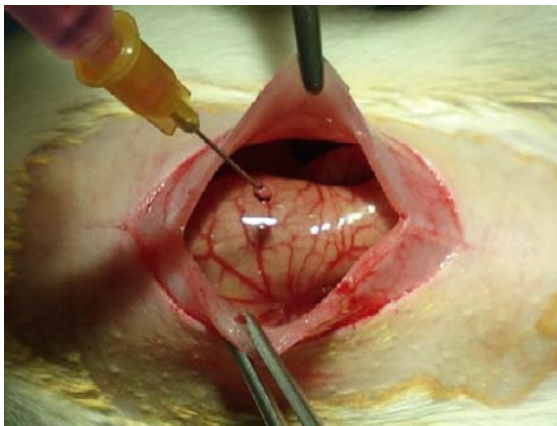
Alle Tiere erhielten eine subkutane Schmerzmedikation mit Carprofen (Rimadyl®, Pfizer, 4 mg/kg).



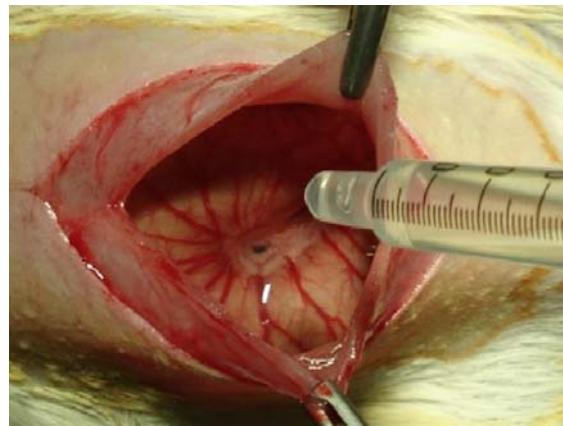
A



B



C



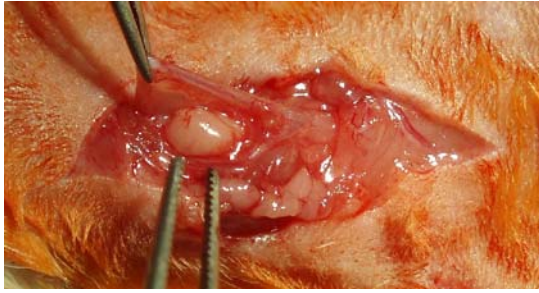
D

Abbildung 4: Ausgewählte Arbeitsschritte während der medianen Laparotomie. Nach Eröffnung der Bauchhöhle in der Regio abdominis media und der Linea alba (A) wurde das Coecum eventeriert und auf einer sterilen Kompresse gelagert (B). Die Antrocknung der Serosa führt zu Mikroläsionen, wie sie bei chirurgischen Eingriffen ebenfalls beobachtet werden. Im Anschluss an die Tumorzellapplikation auf das reponierte Coecum (C) erfolgte die erste Applikation der Therapielösung bei intraperitoneal zu behandelnden Tieren noch intraoperativ.

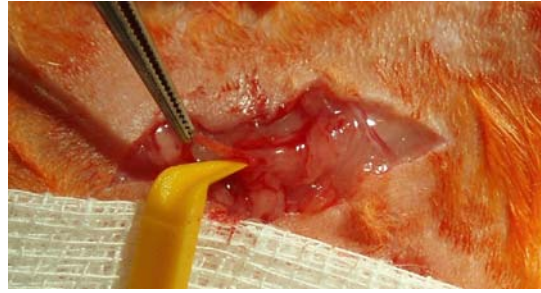
Portimplantation

Um eine intravenöse Therapie zu gewährleisten, musste dazu ein dauerhafter venöser Zugang gelegt werden. Dies erfolgte durch eine Implantation eines Portkathetersystems (Access technologies, Skokie, Illinois, USA) in die rechte Vena jugularis externa.

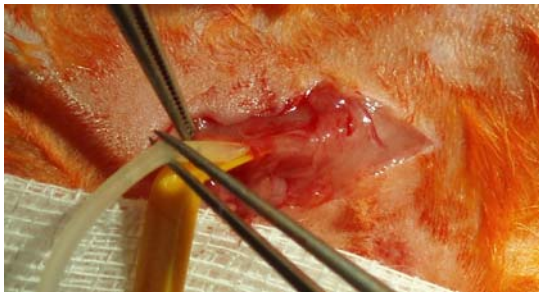
Nach der Vorbereitung des abdominalen Operationsfeldes erfolgte eine identische Vorbereitung des rechten Hals-/Schulterbereiches. An den in Rückenlage gelagerten Tieren wurde eine circa ein Zentimeter lange Inzision der Haut über der Vena jugularis beziehungsweise des Musculus sternocleidomastoideus durchgeführt. Zunächst erfolgte die stumpfe Präparation einer Hauttasche für den Port an der lateralen Halsseite. Nun wurde die Vene präpariert und dargestellt. Um den proximalen Abschnitt der Vene wurde eine Ligatur aus Vicryl der Stärke 4/0 vorgelegt. Nach Fixation der Vene erfolgte deren Eröffnung quer zum Verlauf. In die Öffnung wurde zunächst ein Introducer zum Weiten des Lumens nach proximal eingeführt. Zwischen dem Introducer und der Gefäßwand wurde nun der eigentliche Portkatheter circa einen Zentimeter vorsichtig nach proximal vorgeschoben und gleichzeitig der Introducer zurückgezogen. Die vorgelegte Ligatur wurde nun über dem Katheter befestigt und dieser damit fixiert. Nach Überprüfung der korrekten Lage und der Durchlässigkeit erfolgte die erste Applikation der Therapielösung. Der Port wurde in die Hauttasche geschoben, die Haut fortlaufend mit einem Vicrylfaden der Stärke 4/0 verschlossen und mit Jodlösung und Sprühverband versorgt.



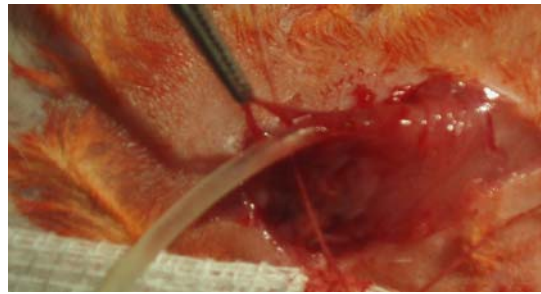
A



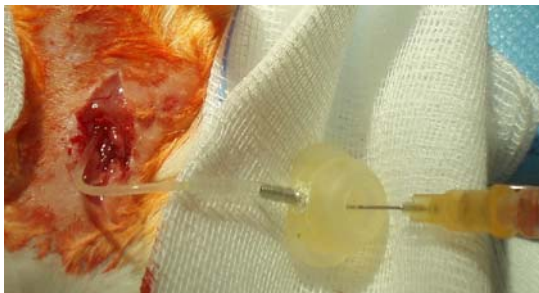
B



C



D



E



F

Abbildung 5: Ausgewählte Arbeitsschritte während der Portimplantation . Nach Inzision der Haut im ventralen Bereich der rechten Halsseite und der Darstellung der V. jugularis (A) wurde ein Introducer in die quer eröffnete Vene eingeführt (B), über den der Kunststoffkatheter des Portsystems vorgeschoben wurde (C). Mittels einer Ligatur erfolgte die Fixierung des Katheters in der Vene (D). Im Anschluss an die erste intravenöse Therapiegabe noch intraoperativ (E) wurde die Portkammer in der dafür angelegten Hauttasche verstaut (F).

Portexplantation

Einen Tag nach der letzten Gabe der intravenösen Therapie erhielten diese Tiere erneut eine gewichtsabhängige Injektionsvollnarkose mit Xylazin und Ketamin wie oben beschrieben. Die rechte Halsseite wurde rasiert und desinfiziert. Es erfolgte ein Hautschnitt circa einen halben Zentimeter neben und parallel zu dem zur Portimplantation. Vorsichtig wurde der Port von der um ihn als Fremdkörperreaktion gebildeten Kapsel gelöst und vorverlagert. Danach wurde die Vena jugularis externa freipräpariert und die Stelle aufgesucht, an der der Portkatheter in die Vene eintritt. Diese Stelle wurde fixiert und locker angeklemt, der Portkatheter wurde langsam aus dem Lumen zurückgezogen und die Vene umgehend an der offenen Stelle für circa eine halbe Minute komprimiert, um unnötigen Blutverlust zu vermeiden. Soweit möglich, wurde die gebildete Kapsel entfernt, die Wundhöhle mit Jodlösung gespült und die Haut fortlaufend mit einer Vicrylnaht der Stärke 4/0 verschlossen. Die Nahtstelle wurde mit Jodlösung desinfiziert und mit einem Sprühverband abgedeckt.

3.4.4 Randomisierung und Therapie

Für die Untersuchung des Einflusses von BTB14431 und Emodin auf das Tumorwachstum von Kolonadenokarzinomzellen wurde BTB14431 in drei und Emodin in zwei unterschiedlichen Dosierungen verabreicht. Zudem wurde jeweils eine intravenöse einer intraperitonealen Applikation gegenübergestellt. Die jeweilige Kontrollgruppe erhielt Ringer - Lactat - Lösung. So ergaben sich zwölf Therapiegruppen mit je zehn Tieren wie in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Zuordnung zu einer Therapiegruppe erfolgte zufällig und unmittelbar nach der Zellapplikation während der Laparotomie.

Kurz- bezeichnung	Gruppe A (intravenöse Therapie)	Gruppe B (intraperitoneale Therapie)
Ko	Ringer-Lactat iv (Kontrolle)	Ringer-Lactat ip (Kontrolle)
B1	BTB14431 iv 0,3 mg/kg KG	BTB14431 ip 0,3 mg/kg KG
B2	BTB14431 iv 1,7 mg/kg KG	BTB14431 ip 1,7 mg/kg KG
B3	BTB14431 iv 3,3 mg/kg KG	BTB14431 ip 3,3 mg/kg KG
E1	Emodin iv 5 mg/kg KG	Emodin ip 5 mg/kg KG
E2	Emodin iv 10 mg/kg KG	Emodin ip 10 mg/kg KG

Tabelle 3: Therapiegruppen

Die Therapielösungen wurden so hergestellt, dass jedem Tier jeweils gleiche Volumina von einem Milliliter Therapielösung intravenös beziehungsweise intraperitoneal appliziert wurden. Die Applikationen erfolgten beginnend mit der ersten Injektion während der Operation zweimal täglich im Abstand von 12 Stunden sieben Tage lang, sodass insgesamt 14 Injektionen vorgenommen wurden.

Für die Gabe der *intravenösen Therapie* mussten die Tiere in eine ca. zwei Minuten andauernde Isofluraninhalationsnarkose versetzt werden. Erst nach Immobilisation der Tiere war es möglich, die Therapielösung korrekt über den Port zu injizieren. Um die Kreislaufbelastung möglichst gering zu halten, wurde eine Injektionszeit von einer Minute gewählt. Um Lösungsrückstände im Portsystem zu vermeiden, wurde dieser anschließend jeweils mit 0,2 ml isotonischer Natriumchloridlösung gespült.

Für die Gabe der *intraperitonealen Therapie* wurden die Tiere ohne Narkose fixiert und die Injektion erfolgte im Bereich des dritten oder vierten abdominalen Quadranten zügig und unter Schonung des Darmkonvolutes durch die Bauchdecke.

Vor jeder Manipulation wurde der Allgemeinzustand des Tieres kontrolliert, wobei vor allem der Habitus, die Atmung und der Zustand des Felles beurteilt wurden.

Vor der letzten Therapieapplikation wurde das Gewicht der Tiere bestimmt.

3.4.5 Blutbild

Den Tieren wurden mittels einer Glaskapillare aus der Schwanzvene Blutproben von ca. 0.2 ml zu zwei verschiedenen Zeitpunkten entnommen: Am Tag eins der Therapie unter Vollnarkose unmittelbar präoperativ und am Tag nach der letzten Therapiegabe entweder unter Vollnarkose vor der Portexplantation oder unter oben beschriebener Kurznarkose mit Isofluran. Jede Blutprobe wurde in einem gekennzeichneten heparinbeschichteten Eppendorfgefäß aufgefangen und bei +4°C bis zur Bearbeitung gelagert.

Ermittelt wurden folgende Parameter:

- Hämatokrit (l/l)
- Erythrozytenzahl (/nl)
- Thrombozytenzahl (/nl)
- Leukozytenzahl (/nl)
- Differentialblutbild:
- Lymphozytenzahl (10^3 / μ l)
- Monozytenzahl (10^3 / μ l)
- Anzahl von Neutrophilen, Basophilen und Eosinophilen Granulozyten (10^3 / μ l)

3.4.6 Kontrolle des Allgemeinbefindens der Tiere

Die Tiere wurden über den gesamten Studienzeitraum täglich durch einen Arzt oder geschulte Tierpfleger bezüglich ihres Allgemeinbefindens begutachtet. Dabei wurden die Futteraufnahme, das Sozialverhalten im Kontakt zu Artgenossen, das Erkundungsverhalten, das Putzverhalten, die Atmung und die Körperhaltung beurteilt. Zusätzlich wurde darauf geachtet, ob die Tiere ihr Fell aufstellten und ob ihre Augen klar und normal geöffnet erschienen.

3.4.7 Obduktion und Bestimmung des Tumorgewichts

28 Tage nach der Tumorzellapplikation bzw. 21 Tage nach dem Ende der Therapiegabe wurden die Tiere in einer luftdichten Kammer, in die Kohlenstoffdioxid eingeleitet wurde, euthanasiert.

Nach Bestimmung des Körpergewichtes erfolgte die geblindete Obduktion der Tiere. Zunächst wurde im Bereich der Nackenfalte, in die vier Wochen zuvor die Kolonadenokarzinomzellen injiziert wurden, ein Hautschnitt vom Os occipitale bis zum Schulterbereich angelegt und das subkutane Gewebe gründlich inspiziert. Vorhandenes Tumorgewebe wurde sorgfältig vom umgebenden Bindegewebe separiert, entfernt, die einzelnen Tumorknötchen gezählt und insgesamt gewogen.

Danach wurde die Bauchhöhle paramedian vom Sternum bis zum kleinen Becken eröffnet und ein Entlastungsschnitt entlang des Rippenbogens angelegt. Die paramediane Schnittführung ermöglichte eine Kontrolle auf das Vorliegen von Inzisionsmetastasen im Bereich der Linea alba nach der medianen Laparotomie. Die Inspektion der Bauchhöhle erfolgte standardisiert, beginnend mit dem Peritoneum, gefolgt vom kleinen Becken und systematisch nach cranial fortgesetzt bis zum Zwerchfell (kleines Becken, Blase, Nieren, Milz, Magen, Bauchspeicheldrüse, Dünn-, Blind- und Dickdarm jeweils mit Gekröse, Leber, Zwerchfell). Wie im Nackenbereich erfolgte auch hier die Lokalisation und die Präparation der vorhandenen Tumorknötchen, deren Auszählung und Gewichtsbestimmung. Diese Daten wurden auf standardisierten Bögen zusammen mit der zugehörigen Tiernummer, dem Körpergewicht, den Operations- und Therapiedaten dokumentiert.

3.4.8 Kontrolle der Wundheilung

Die Operationswunden bzw. später -narben wurden über den gesamten Studienzeitraum täglich durch einen Arzt oder geschulte Tierpfleger makroskopisch begutachtet. Dabei sollte festgestellt werden, ob Wundheilungsstörungen wie Wundschwellung, Wundsekretion, Nahtdehiszenz oder Narbenbruch vorliegen. Zu Beginn der Obduktion bei Eröffnung der

Bauchhöhle erfolgte dann die Entnahme von Gewebeproben aus dem oberen (kranialen), dem mittleren und dem unteren (kaudalen) Drittel des gesamten Wundbereiches, also Muskelschicht gemeinsam mit darüber liegendem Hautareal. Von diesen Proben wurden histologische Schnitte angefertigt und anschließend einer HE(Haemalaun-Eosin)-Färbung unterzogen. Unter einem Lichtmikroskop wurden Zelldissemination, Zell- und Zellkernmorphologie (rund, ovoid, spindelförmig) untersucht.

3.5 Statistische Auswertung

Die Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte mit "SPSS15.0 für WINDOWS" (SPSS Inc. Chicago, Ill.). Zunächst wurden Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test für beliebig viele unabhängige Stichproben auf Unterschiede geprüft. Um zwei Gruppen (Kontrolle und Therapie) direkt miteinander zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test für ungekoppelte Paare angewandt. Die Ergebnisse wurden als signifikant bezeichnet, wenn für die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0.05$ zutraf.

Die Grafiken wurden mittels box-whisker-plots dargestellt. Er gibt neben dem Median, die untere und die obere Quartile (box) sowie 1,5 Quartildifferenzen (whisker) an.

4 Ergebnisse

4.1 Gruppenbesetzung

Mit insgesamt 120 WAG/Rij-Ratten wurde die in dieser Arbeit beschriebene Studie begonnen. 17 Tiere verstarben vor der geplanten Euthanasie (vgl. Kapitel 4.6 Todesfälle). Somit konnten nur die vollständig erhobenen Daten von 103 Tieren zur statistischen Auswertung herangezogen werden. Diese 103 Tiere wurden wie in Tabelle 4 dargestellt den Therapiegruppen zugeordnet.

	Reihe A (i.v.)	Reihe B (i.p.)
Kontrollgruppe	n = 10	n = 9
B1 (BTB14431 0,3 mg/kg)	n = 9	n = 11
B2 (BTB14431 1,7 mg/kg)	n = 11	n = 9
B3 (BTB14431 3,3 mg/kg)	n = 9	n = 9
E1 (Emodin 5 mg/kg)	n = 7	n = 9
E2 (Emodin 10 mg/kg)	n = 0	n = 10
Summe	46	57

Tabelle 4: Anzahl (n) der Tiere in den einzelnen Therapiegruppen Die „Kontrollgruppe“ erhielt Ringer-Lactat-Lösung. In Reihe A sind alle intravenös behandelten, in Reihe B alle intraperitoneal behandelten Tiere zusammengefasst.

28 Tage nach der Tumorzellapplikation und 21 Tage nach Therapieende wurden die Ratten euthanasiert und obduziert. Bei vielen Tieren wurden bei der Obduktion makroskopisch zahlreiche Tumore gefunden. Nach der Injektion der Tumorzellen in das Unterhautgewebe der Nackenfalte, in dem sich die Tumorzellen kaum ausbreiten konnten, wurden im Nackenbereich nur einzelne solide Tumorknoten gefunden. Die Tumoren im Bereich der Bauch- und Beckenhöhle variierten hingegen in Größe und Lokalisation der Tumoren bzw. der Tumoransammlungen (Rasen) beachtlich, da sich die Tumorzellen hier über die gesamte viszerale Fläche der abdominalen Organe und des Peritoneums verteilen, festsetzten und Primärtumore ausbilden konnten. Teils waren nur vereinzelte Mikrotumoren nachweisbar, teils waren ganze Organe, v. a. das Coecum oder das Peritoneum mit Tumorrasen überzogen (Karzinose). In der Lunge konnten makroskopisch keine Metastasen nachgewiesen werden.

4.2 Tumorgewicht

4.2.1 Tumorgewicht subkutan

In der Reihe A (i.v. behandelte Tiere) konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein vermindertes subkutanes Tumorwachstum zumindest in den Therapiegruppen A-B1, A-B2 und A-E1 beobachtet werden.

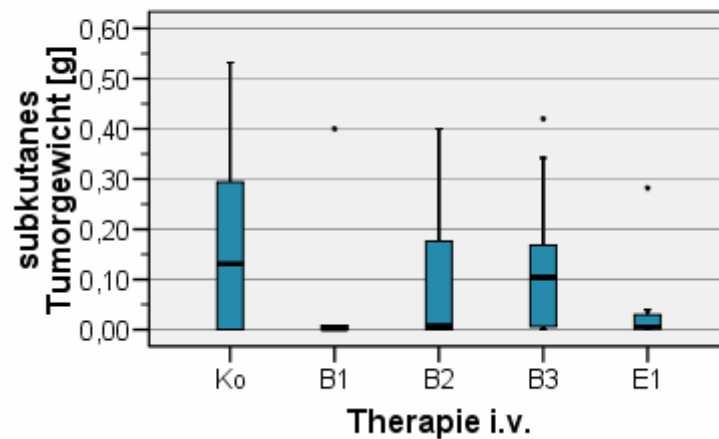


Diagramm 1: Tumorgewicht der subkutanen Metastasen in Reihe A nach Therapie mit BTB14431 (B) und Emodin (E) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko). Die Ergebnisse der Therapiegruppen und der Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

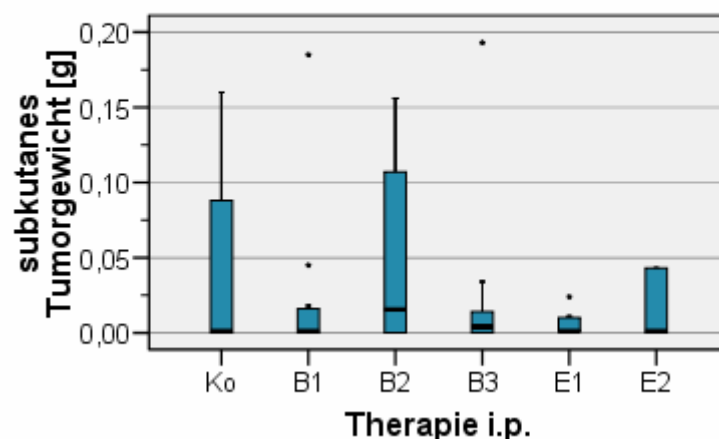


Diagramm 2: Tumorgewicht der subkutanen Metastasen in Reihe B nach Therapie mit BTB14431 (B) und Emodin (E) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko). Die Ergebnisse der Therapiegruppen und der Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Im statistischen Einzelvergleich der Therapiegruppen mit der Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U –Test) finden sich keine Unterschiede. Weder in der Reihe A (i.v. behandelte Tiere) noch in der Reihe B (i.p. behandelte Tiere) konnte ein Einfluss von Emodin oder BTB14431 auf das subkutane Tumorstadium festgestellt werden. Die Daten aller Therapiegruppen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede zu der jeweiligen Kontrollgruppe untersucht, die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Reihe A	B1 < 0,01 (0-0,4)	B2 0,01 (0-0,4)	B3 0,1 (< 0,01-0,42)	E1 0,01 (0-0,28)	E2 ----- -----
Kontrolle 0,13 (0-0,53)	p = 0,222	p = 0,549	p = 1,000	p = 0,351	-----
Reihe B	B1 < 0,01 (0-0,19)	B2 0,02 (0-0,16)	B3 < 0,01 (0-0,19)	E1 < 0,01 (0-0,02)	E2 < 0,01 (0-0,44)
Kontrolle < 0,01 (0/0,3)	p = 0,824	p = 0,842	p = 0,730	p = 0,796	p = 0,968

Tabelle 5: Vergleich des subkutanen Tumorgewichtes (in Gramm) der Therapiegruppen versus Kontrollgruppe Reihe A und B mittels Mann-Whitney-U-Test. Unter der Gruppenbezeichnung ist der Median aufgeführt, darunter in Klammern Minimal- und Maximalwert, außerdem die exakte Signifikanz p.

4.2.2 Tumorgewicht intraperitoneal

In der Reihe A (i.v. behandelte Tiere) war im Vergleich zur Kontrollgruppe ein vermindertes intraperitoneales Tumorgewicht in den Therapiegruppen A-B1 und A-E1 zu verzeichnen. Eine steigende Dosis führte nicht zu einer Suppression des intraperitonealen Tumorgewichts. Es wurde bei einer Konzentration von 3,3 mg/kg BTB14431 vereinzelt ein höheres Tumorgewicht festgestellt.

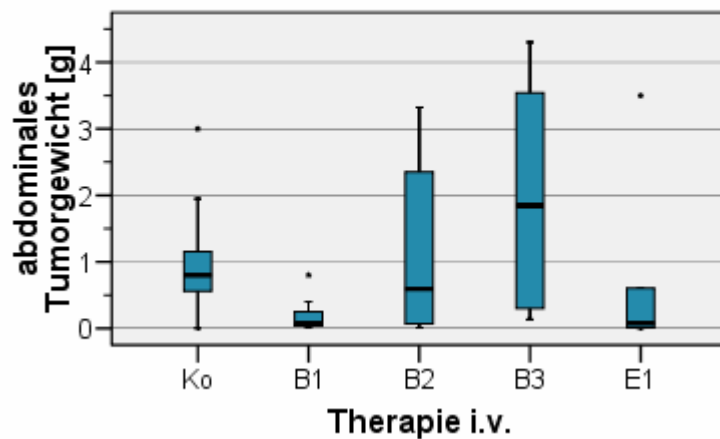


Diagramm 3: Tumorgewicht der abdominalen Metastasen in Reihe A nach Therapie mit BTB14431 (B) und Emodin (E) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko). Die Ergebnisse der Therapiegruppen und der Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

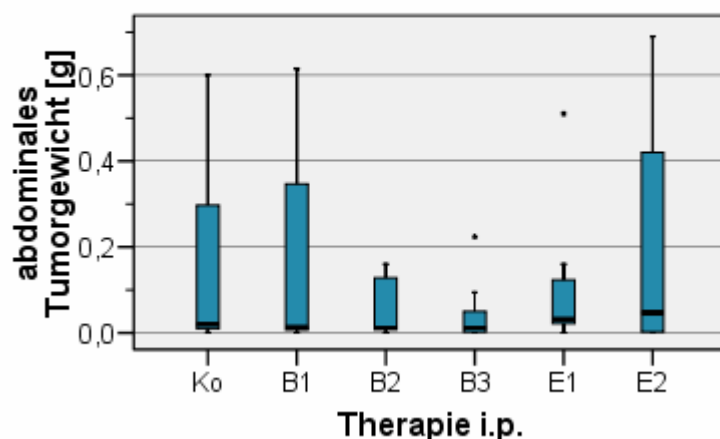


Diagramm 4: Tumorgewicht der abdominalen Metastasen in Reihe B nach Therapie mit BTB14431 (B) und Emodin (E) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko). Die Ergebnisse der Therapiegruppen und der Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Der Mann-Whitney-U-Test bestätigte ein signifikant vermindertes intraperitoneales Tumorgewicht lediglich in der Therapiegruppe A-B1 ($p=0,05$). Die anderen Behandlungen führten nicht zu einer Änderung des Tumorwachstums ($p>0,05$).

In der Reihe B (i.p. behandelte Tiere) zeigte sich bei allen Tieren ein deutlich geringeres intraperitoneales Tumorwachstum als in Reihe A. Unterschiede zur Kontrollgruppe konnten jedoch nicht festgestellt werden. Die exakte Signifikanz p , ermittelt durch den Mann-Whitney-U-Test, lag stets über 0,05. Die ermittelten Werte der einzelnen Gruppen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Reihe A	B1 0,7 ($< 0,1-0,8$)	B2 0,59 (0,01-3,3)	B3 1,85 (0,13-4,3)	E1 0,08 ($< 0,01-3,5$)	E2 ---- ----
Kontrolle 0,8 (0-3,0)	$p = 0,050$	$p = 0,968$	$p = 0,182$	$p = 0,252$	----
Reihe B	B1 0,01 (0-1,6)	B2 0,01 (0-1,6)	B3 0,01 (0-0,22)	E1 0,03 (0-0,51)	E2 0,05 ($< 0,01-0,69$)
Kontrolle 0,02 ($< 0,01-1,2$)	$p = 0,710$	$p = 0,549$	$p = 0,258$	$p = 0,931$	$p = 0,842$

Tabelle 6: Vergleich der abdominalen Tumorgewichte (in Gramm) der Therapiegruppen vs. Kontrollgruppe in Reihe A und B mittels Mann-Whitney-U-Test. Unter der Gruppenbezeichnung ist der Median aufgeführt, darunter in Klammern Minimal- und Maximalwert, außerdem die exakte Signifikanz p .

4.3 Tiergewicht

Das Körpergewicht der einzelnen Tiere differierte zu den Messzeitpunkten teilweise stark. Dies wird in Diagramm 5 und Diagramm 6 deutlich. Betrachtet man den Verlauf des Körpergewichtes während des Aufenthaltes, war in allen elf Therapiegruppen zu beobachten, dass sich das Körpergewicht der Tiere unter der Therapie verringerte, obwohl sich die Tiere noch in der Wachstumsphase befanden. Daraufhin stieg das Körpergewicht allerdings schnell wieder an, bis es 21 Tage nach Ende der Therapietage am Tag der Obduktion deutlich über dem Ausgangsgewicht lag.

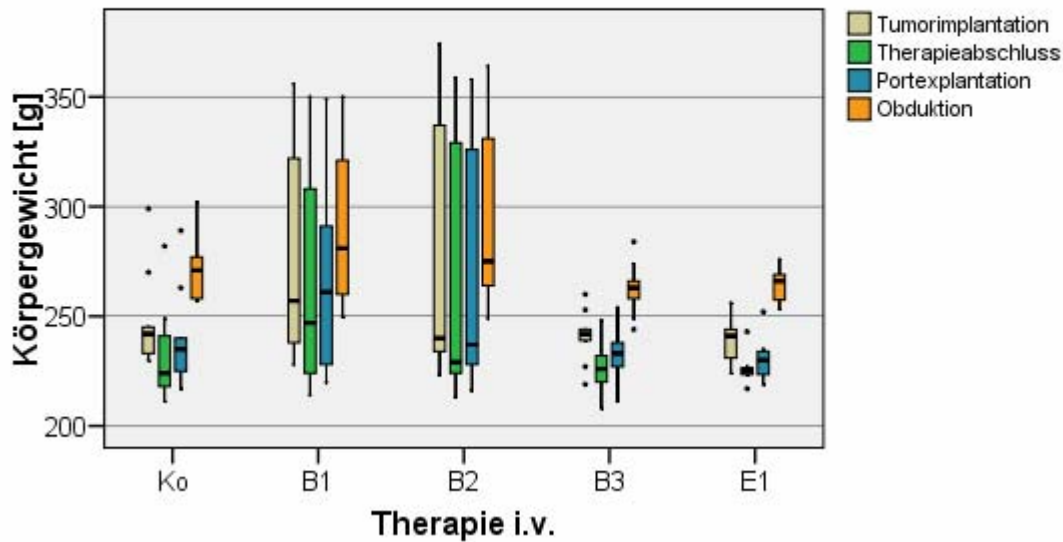


Diagramm 5: Körpergewichte der Tiere in Reihe A zu den vier verschiedenen Messzeitpunkten OP1/Therapietag eins, Therapietag sieben, OP2 (zwei Tage nach Therapieende) und am Tag der Obduktion. Es wird deutlich, dass alle Tiere zunächst minimal an Gewicht verlieren. Alle Tiere erholen sich bis zum Therapieende. Es gibt keine statistischen Unterschiede im Vergleich der Therapiegruppen mit der Kontrollgruppe ($p \geq 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

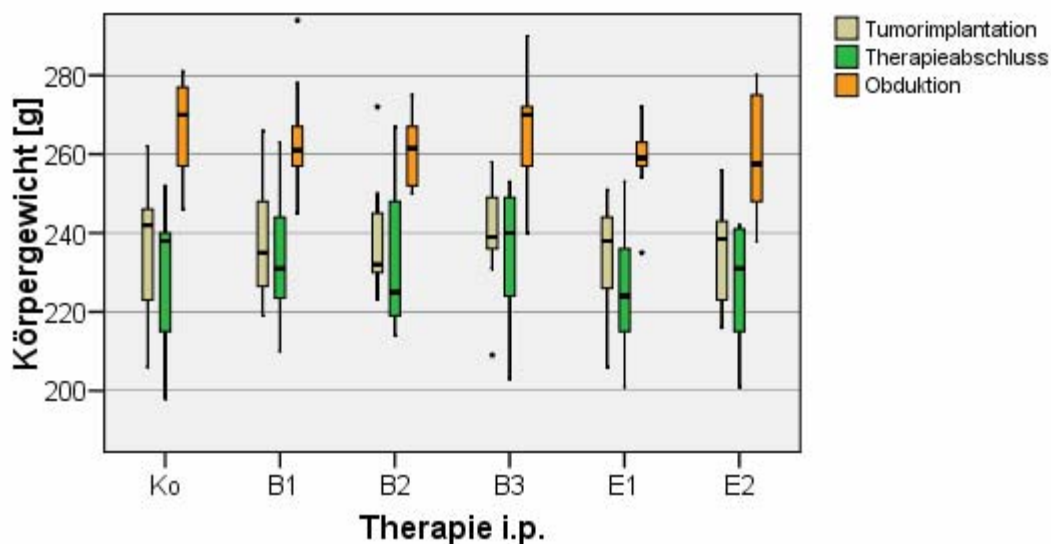


Diagramm 6: Körpergewichte der Tiere in Reihe B zu den drei verschiedenen Messzeitpunkten OP1/Therapietag eins, Therapietag sieben und am Tag der Obduktion. In allen Therapiegruppen ist die Gewichtsentwicklung im Studienzeitraum ähnlich ($p > 0,05$).

Zur objektiveren Darstellung wurde die Differenz des Körpergewichtes zwischen zwei Messpunkten (zur Tumorimplantation und an Therapietag sieben bzw. an Therapietag sieben und Tag der Obduktion) als relative Gewichtsveränderung ermittelt. Dadurch wurde das Ausmaß der Körpergewichtsabnahme im Therapiezeitraum (zwischen Tumorimplantation und der letzten Injektion am Therapietag sieben) noch klarer (Median i.v. -5,4% / i.p. -2,6%). Der Vergleich der Therapiegruppen gegen die jeweilige Kontrollgruppe mittels Mann-Whitney-U-Test ergab keine Unterschiede ($p > 0,05$). Im Vergleich der beiden Applikationsformen (i.v. gegen i.p.) der jeweiligen Therapiegruppe wird jedoch deutlich, dass die i.v. behandelten Tiere in allen vergleichbaren Gruppen außer B2 signifikant stärker an Körpergewicht verloren als die i.p. behandelten (Tabelle 7).

Therapiegruppe	Ko	B1	B2	B3	E1
p	0,001	0,012	0,063	0,010	0,046
Median Reihe A	-6,25	-4,4	-3,9	-5,2	-6,25
(Min/Max) Reihe A	(-8,3/-1,6)	(-6,7/-1,7)	(-6,9/-1,7)	(-10,4/1,1)	(-7,8/+0,9)
Median Reihe B	-2,1	-0,8	-2,6	-1,2	-3,5
(Min/Max) Reihe B	(-4,0/+2,0)	(-5,4/+1,6)	(-6,0/+3,5)	(-5,2/+1,2)	(-5,9/+1,2)

Tabelle 7: relative Änderung des Körpergewichts in Prozent der i.v. (Gruppe A) behandelten vs. i.p. (Gruppe B) behandelten Tiere im Zeitraum der sieben Therapietage. Der statistische Vergleich der Reihen A und B durch den Mann-Whitney-U-Test ergab die exakte Signifikanz p. Zusätzlich dargestellt sind der Median sowie darunter in Klammern mit Min und Max die Streubreite der Gewichtsänderungen in den zehn vergleichbaren Therapiegruppen. In allen Therapiegruppen außer B2 verminderte sich das Körpergewicht der i.v. behandelten Tiere signifikant stärker als das der i.p. behandelten ($p \leq 0,05$).

Im Zeitraum von Therapietag sieben bis zur Euthanasie nahm das Körpergewicht der Tiere unabhängig von Therapie und Applikationsform erwartungsgemäß wieder zu (Median i.v. +17% / i.p. +15%).

4.4 Blutbild

Es wurde die prozentuale Änderung der Blutwerte (Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Leukozyten, Thrombozyten, Differentialblutbild) zwischen den zwei Blutentnahmen (prä OP und Tag sieben der Therapie/Therapieabschluss) zur Berechnung und Bewertung

herangezogen. Sowohl die einzelnen Messwerte als auch die prozentuale Änderung dieser wurden mittels Mann-Whitney-U-Test mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

Hämatokritwert und Erythrozytenzahl zeigten in diesem Zeitraum keine gruppenspezifischen Veränderungen und lagen im physiologischen Bereich.

4.4.1 Leukozyten

Im Therapiezeitraum stiegen die Leukozytenzahlen außer in Gruppe A-B3 an. Der Unterschied wird deutlicher, wenn ein Vergleich zwischen den i.v. behandelten Tieren und den i.p. behandelten Tieren vorgenommen wird (Diagramm 7). Es ließen sich jedoch keine statistischen Änderungen ableiten ($p > 0,05$).

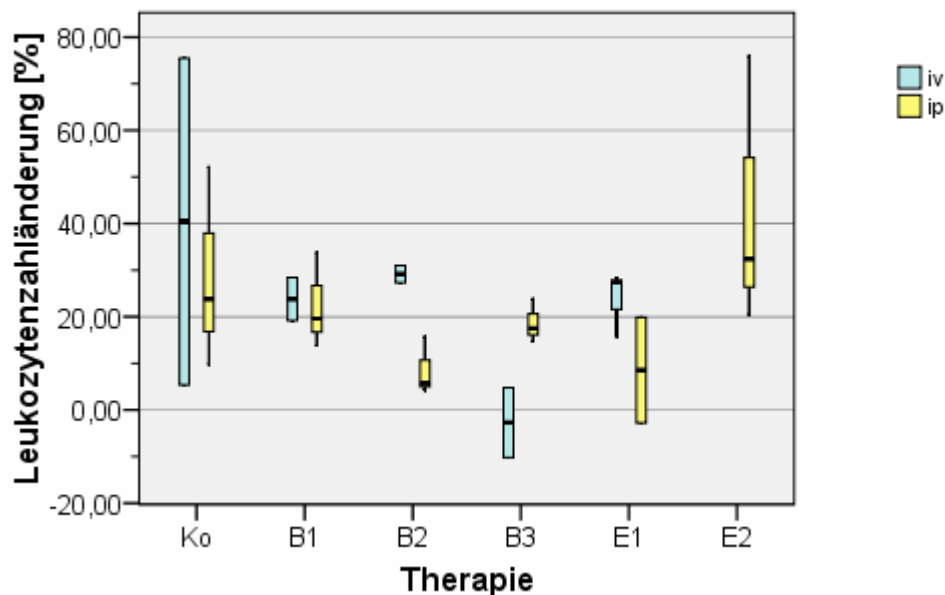


Diagramm 7: relative Änderung der Leukozytenzahl im Therapiezeitraum Die Daten der i.v. (Reihe A) behandelten Tiere sind denen der i.p. (Reihe B) behandelten in jeder Therapiegruppe vergleichend gegenübergestellt. Die Leukozytenzahlen der Reihe B steigen weniger stark an als die der Reihe A. Während die Leukozytenzahlen der Reihe A in den Gruppen B1, B2 und E1 um 23-29% steigen, sinken sie in Gruppe B3 um 3%.

4.4.2 Thrombozyten

Die Anzahl der Thrombozyten (je μl) nahm im Therapiezeitraum außer in Reihe B Gruppe E2 zu. Dieser Anstieg war bei den i.v. behandelten Tieren stärker zu beobachten als bei den i.p. behandelten (Diagramm 8). Die Änderungen waren nicht statistisch signifikant.

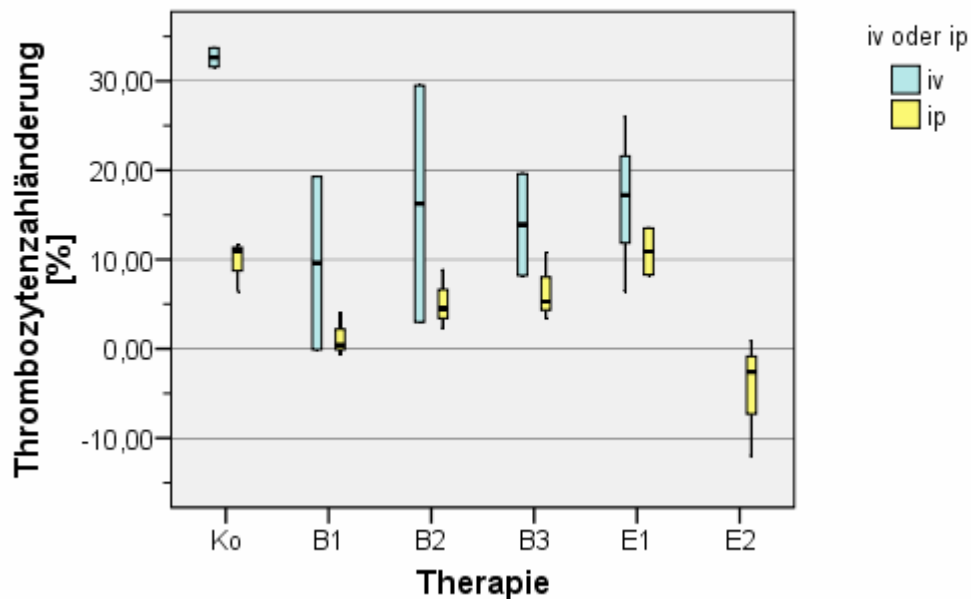


Diagramm 8: : relative Änderung der Thrombozytenzahl im Therapiezeitraum Die Daten der i.v. (Reihe A) behandelten Tiere sind denen der i.p. (Reihe B) behandelten in jeder Therapiegruppe vergleichend gegenübergestellt. In Reihe A steigen die Thrombozytenzahlen etwas stärker an als in Reihe B, zwischen den Therapiegruppen gibt es jedoch kaum Unterschiede. Ein auffälliger Anstieg um 33% ist in der Kontrollgruppe der Reihe A und ein Absinken um 3% in der E2-Gruppe der Reihe B zu verzeichnen.

4.4.3 Peripheres venöses Blutbild / Differentialblutbild

Sowohl nach der intravenösen als auch nach der intraperitonealen Therapie war eine geringgradige relative Abnahme der Lymphozyten- und Monozytenzahlen je μl zu beobachten. Stattdessen erhöhte sich der relative Anteil der neutrophilen Granulozyten und teilweise der eosinophilen Granulozyten. Monozyten und Granulozyten waren jedoch insgesamt nur vereinzelt nachzuweisen. Es wurden keine statistisch signifikanten Änderungen festgestellt.

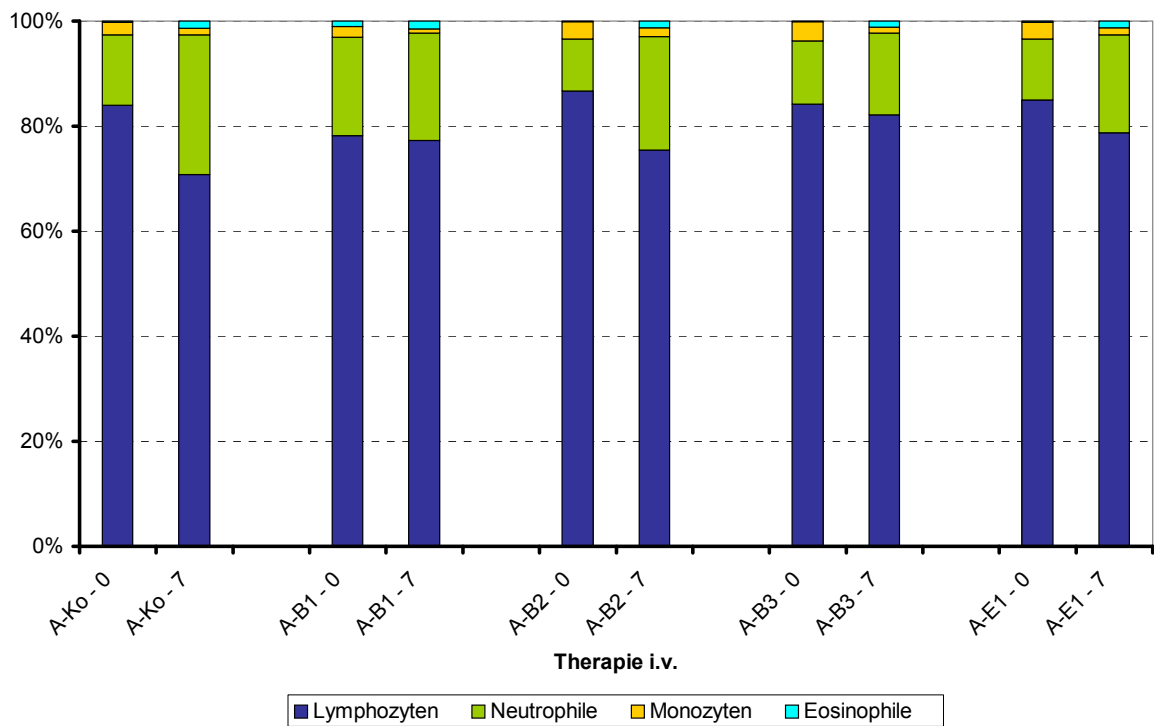


Diagramm 9: Differentialblutbild Reihe A Dargestellt ist der jeweilige relative Anteil (Mittelwerte) der Leukozytenuntergruppen an der Gesamtleukozytenzahl (100%) der Therapiegruppen zu den Zeitpunkten prä OP1 (0) und nach der letzten Therapiegabe (7). In Jeder Therapiegruppe sind nach der Therapiegabe eosinophile Granulozyten nachweisbar, der Anteil der neutrophilen Granulozyten nimmt zu. Der Anteil der Monozyten und Lymphozyten nimmt ab.

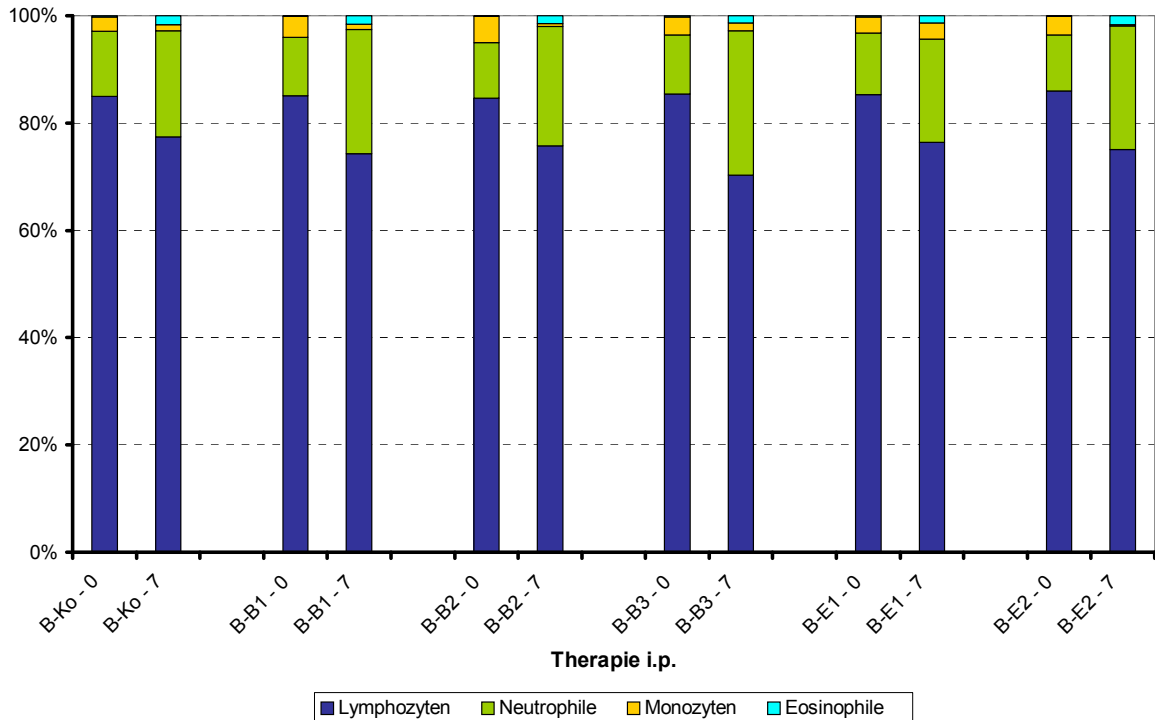


Diagramm 10: Differentialblutbild Reihe B Dargestellt ist der jeweilige relative Anteil (Mittelwerte) der Leukozytenuntergruppen an der Gesamtleukozytenzahl (100%) der Therapiegruppen zu den Zeitpunkten prä OP1 (0) und nach der letzten Therapiegabe (7). Es können Veränderungen analog zu denen der Reihe A beobachtet werden.

4.5 Unerwünschte Wirkungen

Den Tieren der Gruppe A wurde zusätzlich zur medianen Laparotomie, die bei allen Tieren durchgeführt wurde, ein zentralvenöser Port in die rechte Vena jugularis interna implantiert. Nach ca. 50 bis 70 Minuten erwachten die Tiere aus der Narkose und wurden beobachtet. Sie begannen bald darauf die Kontaktaufnahme mit den Artgenossen und die Futteraufnahme. Am folgenden Tag erschienen die Tiere der Gruppe A (intravenöse Therapie unter Isoflurankurznaarkose) deutlich apathischer als die der Gruppe B und zeigten größtenteils ein gestäubtes Fell und eine erhöhte Atemfrequenz, weshalb diese Tiere erneut mit Carprofen (Rimadyl®, Pfizer, 4 mg/kg) behandelt wurden. Ab dem darauf folgenden Tag besserten sich diese Symptome und auf eine weitere Carprofengabe wurde verzichtet. Allerdings waren die Tiere der Gruppe A weiterhin apathischer und nahmen weniger Futter auf als die der Gruppe B.

Auch von der Portexplantation unter Vollnarkose erholten sich die Tiere zügig. Im weiteren Verlauf der Studie zeigten alle Tiere ein ungestörtes Allgemeinbefinden.

4.6 Todesfälle

Von den insgesamt 120 WAG/Rij-Ratten erreichten 103 Tiere das Ende der Studie (Euthanasie 28 Tage nach Tumorzellimplantation bzw. 21 Tage nach Therapieende). 15 Tiere verstarben zu verschiedenen Zeitpunkten des Studienprogramms:

- 1 Tier – während der Injektionsnarkose zur Tumorumplantation
- 1 Tier – während der Injektionsnarkose unmittelbar nach Entfernung des Ports. Bei diesem Tier, das im Therapiezeitraum intravenös Ringer - Lactat - Lösung erhielt, hatte sich in der Hauttasche für den Port ein Abszess gebildet (ca. 3 ml Wundsekret).
- 13 Tiere – den Therapiegruppen wie in Tabelle 8 dargestellt zuzuordnen – während der Inhalationsnarkose für die intravenöse Therapie. Bei allen Tieren setzte während der Injektion die Atmung aus. Trotz einer mindestens drei Minuten andauernden Beatmung konnte eine spontane Atmung nicht wiederhergestellt werden.

Gruppe	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	Portentfernung	Total
A-Ko (n=11)						1		1	2
A-B1 (n=10)						1			1
A-E1 (n=12)	1			1	1		2		5
A-E2 (n=6)	1	1		1	1		2		6

Tabelle 8: Vorkommen von Todesfällen in den Therapiegruppen Aufgeführt sind alle Therapiegruppen, in denen Tiere im Therapiezeitraum (Therapietag T 1-7) verstorben sind, die Anzahl der Tiere, mit denen diese Therapie begonnen wurde (n) und davon die Anzahl der verstorbenen Tiere. In der Gruppe E2 der Reihe A trat eine 100%ige Mortalität auf.

In den Gruppen Kontrolle und B1 sind die verstorbenen Tiere Einzelfälle. In der Gruppe E1 verstarben hingegen anteilig 41,67% und in der Gruppe E2 100% der therapierten Tiere. Aufgrund der einhundertprozentigen Mortalität der Tiere (n=6) in Gruppe E2 wurde diese Gruppe geschlossen und auf einen Therapieversuch an weiteren vier Tieren, wie ursprünglich geplant, verzichtet. Zwei dieser vier Tiere wurden in die Gruppe E1 übernommen. Mit den anderen zwei Tieren wurde eine Therapie mit der halben Dosierung von E1, also 2,5 mg/kg i.v., versucht, wobei eines das Ende der Studie erreichte, jedoch nicht mit in die Auswertung einbezogen werden konnte, und eines in der Inhalationsnarkose vor der Injektion verstarb.

4.7 Aszites und Metastasen im Wundbereich

Bei der Obduktion der Tiere fiel ein gehäuftes Auftreten eines geringgradigen hämorrhagischen Aszites auf (s. Diagramm 11; 36 Tiere; 35%), wobei jedoch keine Peritonitis beobachtet wurde. Auffällig ist eine Korrelation von Aszites und einem hohen intraabdominalen Tumorgewicht (> 0,5 g) vor allem bei den intravenös behandelten Tieren.

	Tiere mit Aszites	Tiere ohne Aszites	Summe
intraabdominales Tumorgewicht > 0,5 g	17	7	24
intraabdominales Tumorgewicht < 0,5 g	4	18	22
Summe	21	26	

Tabelle 9: Zusammenhang von intraabdominalen Tumorgewicht und Aszites in Reihe A (i.v.)

Tiere mit einem intraabdominalen Tumorgewicht von über 0,5 g bildeten deutlich häufiger einen Aszites aus als Tiere, bei Tieren dieses Tumorgewicht unter 0,5 g lag.

Bei insgesamt fünf Tieren (5%) traten Tumormetastasen an bzw. in der Bauchmuskelnahrt auf. Beide Merkmale gemeinsam konnten bei 14 Tieren (14%) beobachtet werden. 64 Tiere (62%) wiesen weder Nahtmetastasen noch einen Aszites auf.

Der relative Anteil der Tiere mit Aszites, Metastasen im Wundbereich, beidem zusammen bzw. ohne in den jeweiligen Therapiegruppen ist in Diagramm 11 dargestellt.

In der i.p. behandelten Reihe B blieben anteilig mehr Tiere unauffällig als in der i.v. behandelten Reihe A, in Gruppe A-B3 wies jedes Tier mindestens eine der genannten Veränderungen auf. In Gruppe B-B2 hingegen ist der Anteil regulärer Befunde mit 80% am höchsten und ein Aszites trat nur zusammen mit Metastasen im Wundbereich auf. In der Gruppe A-B2 konnten keinerlei Metastasen im Wundbereich nachgewiesen werden.

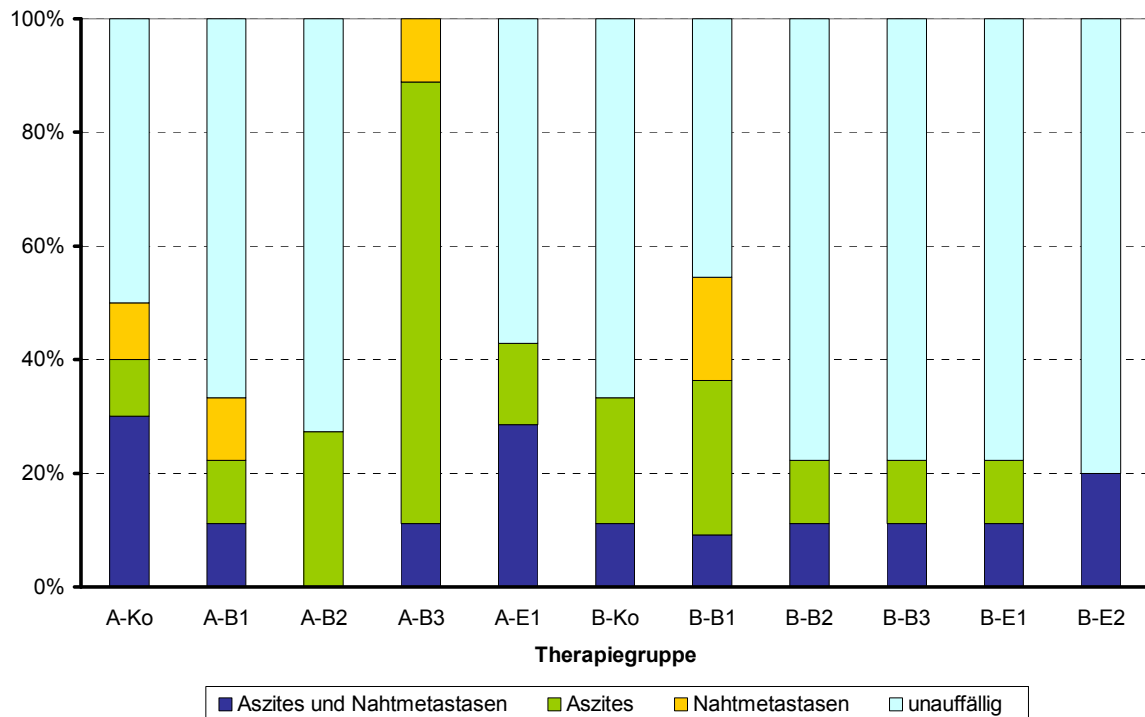


Diagramm 11: Vorkommen von Aszites und Nahtmetastasen in den Therapiegruppen Die Anzahl der Tiere in einer Therapiegruppe, denen das Merkmal „unauffällig“, „Aszites“, „Metastasen im Wundbereich“ oder „Aszites und Metastasen im Wundbereich“ zugeordnet werden konnte, wurde in den prozentualen Anteil umgerechnet, um die Gruppen besser miteinander vergleichen zu können. Die so ermittelten relativen Anteile sind gestapelt für jede Therapiegruppe dargestellt.

4.8 Wundheilung

Makroskopisch konnte keine Wundheilungsstörung der Laparotomiewunden beobachtet werden. Bei einigen intravenös behandelten Tieren wurde ein Wundserom in der collaren Porttasche festgestellt. Unklar war jedoch, ob es sich dabei um Fremdkörperreaktionen oder um Flüssigkeitsaustritt bei oder durch die Injektionen handelte. Klinisch kam es zu keiner Infektion. Die histologische Untersuchung ergab, dass sich alle Proben der abdominalen Wunden in der dritten Phase der Wundheilung befanden. Unabhängig vom Therapieregime zeigten sich jedoch noch vermehrt Fibroblasten und kapilläre Blutgefäße.

5 Diskussion

Die spezifischen Eigenschaften maligner Tumore wie aggressives Wachstum und Metastasierung in andere Organe verursachen oftmals eine beträchtliche Minderung der Lebensqualität und meist eine Verkürzung der Lebenserwartung. Je nach Tumorstadium und Organlokalisation erfolgt bei einigen Tumoren eine chirurgische Therapie, bei der der Primärtumor und zugehörige Lymphknoten reseziert werden. Ergänzt wird diese meist durch eine Chemotherapie und / oder eine Radiotherapie, um das Risiko lokoregionärer Rezidive, einer hämatogenen Metastasierung und vor allem einer durch die chirurgische Intervention bedingte intraperitonealen Streuung von vitalen Tumorzellen zu minimieren. Insbesondere die zur Chemotherapie eingesetzten Therapeutika verursachen jedoch zum Teil zahlreiche unerwünschte Wirkungen. Ein zunehmendes Problem stellt auch die Ausbildung von Resistenzen bestimmter Tumore gegen gängige Chemotherapeutika dar. Insofern ist die Suche nach wirksamen und dabei nebenwirkungsarmen Therapeutika zur Behandlung von malignen Tumoren ein zentrales Anliegen der onkologischen Forschung.

Zellen verfügen über diverse Möglichkeiten, sich vor der Toxizität mutagener Substanzen und der genetischen Instabilität, die aus DNA-Schädigungen resultieren, zu schützen. Eine Schlüsselrolle spielen dabei Kontrollproteine, die den regulären Ablauf des Zellzyklus kontrollieren. Bei der Tumorgenese sind diese Kontrollen modifiziert oder gar nicht aktiv [75]. Auch ist der physiologische, für das homöostatische Gleichgewicht komplexer biologischer Systeme essentielle Prozess der Apoptose fehlreguliert, wodurch das Wachstum von Tumorzellen mit schadhafter DNA und Zellfunktion ermöglicht wird. Da diese Mechanismen charakteristisch für Tumore sind, stellen sie einen viel versprechenden Angriffspunkt für Chemotherapeutika dar, insbesondere weil ausdifferenzierte Zellen dann nicht beeinflusst würden.

Diese Arbeit sollte den Einfluss einer intraperitonealen und intravenösen Therapie mit Emodin und BTB14431 auf das intra- und extraperitoneale Tumorstadium bei Ratten in einem Modell analysiert werden.

5.1 *Material*

Als Versuchstiere wurden 120 männliche WAG/Rij-Ratten gewählt, die bei Versuchsbeginn ca. neun Wochen alt waren. Diese Tiere stellen ein anerkanntes Tiermodell zur Untersuchung des kolorektalen Karzinoms dar, weshalb auch die syngenetische Kolonadenokarzinomzelllinie CC531 als Tumormodell gewählt wurde [76-79].

Nach Voruntersuchungen von Füllbeck et al. [39], die die bereits bekannte antineoplastische Wirkung von Emodin anhand von *in vitro*-Tests mit humanen Zervixkarzinomzellen (HeLa) und B8-Maus-Fibroblasten bestätigen und eine ähnliche Wirkung von BTB14431 feststellen konnten, sollte nun im Tierexperiment deren Wirkung *in vivo* überprüft werden. Hierbei wurde BTB14431 erstmals überhaupt *in vivo* und Emodin erstmals bei einem tierexperimentellen Tumormodell mit Ratten intraperitoneal bzw. intravenös angewandt. Deshalb wurde nicht nur das Tumorwachstum beurteilt, sondern auch das Auftreten toxikologischer Effekte analysiert. Dabei wurden steigende Dosierungen von BTB14431 (0,3; 1,7; 3,3 mg/kg KG) und Emodin (5; 10 mg/kg KG) verwendet, um Dosiswirkungsbeziehungen feststellen zu können.

Aus den pulverförmigen Rohsubstanzen von Emodin und BTB14431 und einer 5%igen Trägerlösung aus Polyvinylpyrrolidon (PVP) und steriler Natriumchloridlösung 0,9% wurden die Injektionslösungen hergestellt. PVP diente dabei als Lösungsvermittler. Um eine geeignete Trägerlösung zu finden, wurden zuvor Lösungsversuche mit den pulverförmigen Substanzen durchgeführt, die beide über ähnliche chemische Eigenschaften verfügen. Nach Angaben von ALEXIS®Biochemicals (www.alexis-biochemicals.com) ist Emodin nicht in Wasser löslich. Eine gute Löslichkeit des Pulvers wird in DMSO, 100% Ethanol oder in stark basischen Lösungen wie 1molarer Ammoniaklösung ($\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$) erreicht. Zu vorliegenden *in vitro* Tests wurde Emodin (soweit angegeben) in DMSO gelöst, ebenso zu *in vivo* Studien, die Emodin jedoch lediglich intraperitoneal verabreichten [64, 80, 81]. Bei einigen anderen *in vivo* Studien wurde Emodin oral in Speiseöl gelöst verabreicht. Zwei chinesische Arbeitsgruppen verwendeten Emodin zwar ebenfalls intravenös, jedoch wurde die Injektionslösung speziell dafür entwickelt und patentiert [82, 83]. Keines der in der Literatur erwähnten Lösungsmittel ist jedoch zur intravenösen Injektion geeignet. Ammoniak, DMSO sowie Ethanol wirken in geringsten Konzentrationen toxisch. Eine ölige Lösung ist in Blut nicht löslich. Lösungsversuche wurden unsererseits mit einer 2,5%igen, einer 5%igen und einer 10%igen PVP-Lösung, mit einer Methylzelluloselösung sowie einer Cremophor EL - Lösung durchgeführt. In einer 2,5%igen PVP-Lösung waren die Substanzen nicht ausreichend gelöst. Mit einer 10%igen PVP-Lösung konnte im Vergleich zur 5%igen Lösung keine verbesserte Löslichkeit erreicht werden. Lösungsversuche mit Methylzellulose bzw. Cremophor ergaben ausflockende Lösungen bzw. unzureichend gelöste Wirkstoffe. Eine 5%ige PVP-Lösung erwies sich somit als am besten geeignet. Diese Lösung wurde dann auch für die intraperitoneale Injektion verwendet, um möglichst gleiche Voraussetzungen für den Ergebnisvergleich von intravenös bzw. intraperitoneal behandelten Tieren zu schaffen.

5.2 Methode

Um die Wirksamkeit von Emodin und BTB14431 unter kliniknahen Bedingungen zu testen wurde angestrebt, eine Situation zu imitieren, die bei der Therapie eines humanen Kolonkarzinoms oft vorkommt: Bei der Resektion des Primärtumors konnte ein Zurückbleiben bzw. Streuen von Tumorzellen in der Bauchhöhle nicht vermieden werden und Tumorzellen konnten bereits metastasieren, sodass eine Fernmetastase im Anfangsstadium (Zellhaufen) existiert. Also erfolgte bei den Ratten eine mediane Laparotomie unter Vollnarkose. Der operative Stress wurde durch die zehnmünütige Vorverlagerung des Coecums und die dadurch bedingte Antrocknung der Serosa simuliert. Die Imitation der im Abdomen verbliebenen vitalen Tumorzellen erfolgte durch die Applikation der Tumorzellsuspension auf das zurückverlagerte Coecum. Eine Fernmetastase wurde durch die Applikation der Tumorzellsuspension subkutan in die Nackenfalte simuliert.

5.3 Beurteilung des Tumorwachstums

In dem in dieser Arbeit vorgestellten Tierexperiment konnte ein Zusammenhang zwischen Applikation von Emodin bzw. BTB14431 und einer Reduktion des Tumorwachstums nicht festgestellt werden (vgl. Diagramm 1 bis Diagramm 4 und Tabelle 5 und Tabelle 6 in Kap. 4.2 Tumorgewicht). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen ein lediglich tendenziell vermindertes Tumorwachstum sowohl subkutan als auch abdominal nach intravenöser Behandlung mit der jeweils niedrigsten Dosierung von BTB14431 (0,3 mg/kg in Gruppe A-B1) bzw. Emodin (5 mg/kg in Gruppe A-E1) im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich mit der Kontrollgruppe (A-Ko) konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Auffällig war der annähernd proportionale Anstieg vor allem des abdominalen Tumorwachstums bei steigenden intravenös verabreichten BTB14431-Dosierungen. Der Median des abdominalen Tumorgewichts in Gruppe A-B3 ist sogar doppelt so hoch wie der Median der Kontrollgruppe. Die steigenden Wirkstoffkonzentrationen stellten offensichtlich eine zunehmende Belastung für den Organismus dar, sodass vor allem die disseminierten Tumorzellen im Abdomen vermehrt wachsen konnten. Als zunehmende Belastung ist daher eine mit der Dauer der Therapiegabe zunehmend stärkere Aktivierung von Reactive Oxygen Species (ROS) aus den Wirkstoffmolekülen Emodin und BTB14431 (vgl. Kap. 1.3.3 Charakterisierung von Emodin) zu bewerten. Gleichzeitig steigt der Stoffwchselfaufwand für den Wirkstoffabbau, was wiederum Immun- und Kreislaufsystem zusätzlich beeinträchtigen könnte. Dies wiederum resultiert in einer geringeren Kapazität des Organismus, eigene Mechanismen gegen Tumorzellen zu aktivieren. Das subkutane und das abdominale Tumorwachstum der intraperitoneal behandelten Tiere einschließlich der

Kontrollgruppe waren gegenüber dem der intravenös behandelten deutlich reduziert. Aber weder durch eine Therapie mit BTB14431 noch mit Emodin konnte ein von der Kontrollgruppe (B-Ko) abweichendes Tumorwachstum erreicht werden.

Das erhöhte Tumorwachstum bei den Ratten, die eine intravenöse Therapie erhielten, könnte auf ein erhöhtes Auftreten von Stressoren zurückzuführen sein. Einerseits erfuhren diese Tiere zusätzliche operative Belastungen durch die Portimplantation und die Portentfernung unter Allgemeinanästhesie nach Abschluss der Therapie. Die Portanlage war verbunden mit einer weiteren Wunde und möglicherweise einer inflammatorischen Reaktion auf den Port als Fremdkörper. Außerdem konnten diese Tiere nur durch eine Inhalationsnarkose behandelt werden (zweimal täglich über sieben Tage), was eine erhöhte Stoffwechsel- und Kreislaufbelastung bedeutete. Dadurch war das Allgemeinbefinden der Tiere einschließlich der Futteraufnahme zumindest kurzzeitig nach jeder Narkose beeinträchtigt.

Im Gegensatz zur systemischen Applikation, bei der sich die Substanz im gesamten Körper verteilt und nur ein unbestimmter Teil der verabreichten Dosis den Tumor erreicht, wird dieser durch lokoregionäre Gabe in das Abdomen einer wesentlich höheren Wirkstoffkonzentration ausgesetzt, was zusätzlich die deutlich geringere abdominale Tumorbelastung der intraperitoneal behandelten Tiere erklären könnte (Medianwerte der intravenös behandelten Tiere: 0,59 – 1,85; der intraperitoneal behandelten: 0,01 – 0,05).

Das Ergebnis der vorliegenden Studie, dass eine signifikante Suppression des Tumorwachstums weder durch Emodin noch BTB14431 erreicht werden konnte, steht im Gegensatz zu dem der Studien von Füllbeck et al. [39], die *in vitro* eine hohe Wirksamkeit der Substanzen zumindest gegenüber humanen Zervixkarzinomzellen (HeLa) und B8-Maus-Fibroblasten nachwies.

5.3.1 Antikancerogene Wirkung von Emodin *in vitro*

Emodin wirkt jedoch unterschiedlich auf verschiedene Tumorzelllinien, da spezielle zelluläre Systeme beeinflusst werden, deren Modifikation sich unter den Tumorarten unterscheiden. Die antikancerogene Wirkung von Emodin, deren Grundlage die Inhibition des Zellwachstums durch Zellzyklusunterbrechung und Apoptose darstellt, konnte *in vitro* auch bei diversen anderen Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Kamei et al. untersuchten den wachstumshemmenden Effekt von Chinonen, darunter Emodin, an HCT-15-Zellen eines humanen Kolonkarzinoms. Nach einer Inkubation mit verschiedenen Dosierungen über fünf Tage konnte eine 50%ige Suppression des Zellwachstums bei einer Emodinkonzentration von 12,5 µg/ml erreicht werden. Signifikante Wachstumssuppressionen konnten im Allgemeinen nur bei Anthrachinonen wie Emodin mit zwei oder mehr Hydroxylgruppen verzeichnet werden, wobei lediglich Emodin ein Fortschreiten des Zellzyklus in Phase G1/S

(im Gegensatz zu Phase S) blockieren konnte [72]. Auch Lu et al. beobachteten bei HCT-116-Kolonkarzinomzellen nach Gabe einer 40 μM Emodinlösung Apoptose und eine Unterbrechung des Zellzyklus in der G2/M-Phase [84].

Eine besondere Eigenschaft von Emodin besteht in dessen selektiv antikanzerogenen Wirkung auf bestimmte Tumorzelllinien. Zhang et al. konnten bei Protoonkogen HER-2/neu überexprimierenden und damit besonders malignen Brustkrebszellen (MDA-MB453, BT-483, AU-565, MDA-MB-361), die für 24 Stunden mit Emodin in einer 40 μM Konzentration versetzt wurden, trotz reduziertem Zellwachstum zwar keinen Zelltod beobachten, stattdessen wurde allerdings ein Fortschreiten der Zelldifferenzierung festgestellt. Außerdem konnten die Auto- und Transphosphorylierungsaktivitäten der HER-2/neu-Tyrosinkinase p185neu, die als Rezeptor für Wachstumsfaktoren fungiert, durch Emodin als Tyrosinkinaseinhibitor (vgl. Molekulare Mechanismen antikanzerogener Effekte in Kapitel 1.3.3 Charakterisierung von Emodin) supprimiert werden. Interessanterweise traten diese Effekte unter identischen Bedingungen kaum bei solchen Zellen auf, die basale p185neu-Level aufweisen, sowohl die Brustkrebszelllinien MDA-MB231, MCF-7 als auch die immortalisierten Brustzellen HBL-KX [55, 81]. Chan et al. verglichen die Wirkung von Emodin auf Onkogen v-ras-transformierte Bronchialepithelzellen mit der auf normale Bronchialepithelzellen. Während der Zellzyklus der transformierten Bronchialepithelzellen in Phase G2/M unterbrochen und das Zellwachstum mit einer Emodinkonzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ halbmaximal reduziert werden konnte (IC_{50}), blieben Effekte in den normalen Zellen selbst bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ aus. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass die v-ras-transformierten Zellen im Gegensatz zu den unveränderten Zellen einen erhöhten Gehalt an bestimmten Phosphotyrosin-haltigen Proteinen aufweisen und Emodin in seiner Eigenschaft als Tyrosinkinaseinhibitor diese Phosphorylierungen verhindert [56].

Shieh et al. konnten in den Zelllinien HepG2/C3A, PLC/PRF/5, und SK-HEP-1 hepatozellulärer Karzinome ein durch Apoptose vermindertes Zellwachstum bei IC_{50} -Werten von 42,5 / 46,6 und 53,1 μM beobachten. Erst nach einer 48-stündigen Inkubation der HepG2/C3A-Zellen mit Emodin in einer 60 μM Konzentration wurden eine Unterbrechung des Zellzyklus in der G2/M Phase und ein signifikanter Anstieg proapoptotischer Faktoren wie p53, p21, Fas und Kaspase3 festgestellt [60]. Wie in der Einleitung beschrieben (vgl. Kapitel 1.2.1 Molekularbiologische Wachstumsregulation eukaryotischer Zellen) nimmt bei diesem Prozess der Tumorsuppressor p53 eine bedeutende Schlüsselrolle ein. Für die in der hier vorgestellten Arbeit verwendete Kolonkarzinomzelllinie CC531 wurde jedoch eine Mutation in Form einer kompletten Deletion der DNA-Bindungsstelle von p53 nachgewiesen [78]. Mit der dadurch unmöglichen Aktivierung des p53-abhängigen Apoptoseweges ließe sich nicht nur eine Resistenz dieser Zellen gegenüber dem Zytostatikum Cisplatin [85]

erklären, sondern auch die ausbleibende tumorsupprimierende Wirkung von Emodin und BTB14431 in unserem Tierexperiment.

In weiteren *in vitro* Versuchen konnte beobachtet werden, dass Emodin eine Aktivierung von ROS induziert, was zu einer nicht selektiven Schädigung der Zellen sowie zu einer Apoptoseinduzierung führt. Jing et al., die wie Shieh et al. [60] die Leberkarzinomzelllinien HepG2/C3A, PLC/PRF/5, und SK-HEP-1 untersuchten, konnten die Wachstumsinhibition durch Apoptose bestätigen. Sie führten diese aber auf die Aktivierung von ROS und daraus resultierender Zerstörung von Mitochondrien, Freisetzung von Cytochrom c und folgender Aktivierung der Kaspasen 3 und 9 zurück [61].

Dieser ROS-Signalweg konnte auch für Ösophaguskarzinomzellen (EC/CUHK1) [64], Zellen des pulmonalen Plattenepithelkarzinoms (CH27, Emodin 50 μ M) und des Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (H460) [67], Adenokarzinomzellen der Lunge (A549, Emodin 50 μ M) [62], Plattenepithelkarzinomzellen der Zunge [86] und Zervixkarzinomzellen (BU 25TK) [87] bestätigt werden. Zusätzlich konnte bei den Bronchialadenokarzinomzellen eine emodininduzierte Inaktivierung von ERK (Extracellular-signal Regulated Kinasen) aus der Familie der MAP-Kinasen mit dem Charakter einer Serin-/Threoninkinase und der für die Proteinkinasen $B\alpha/\beta/\gamma$ kodierenden AKT- Gene festgestellt werden [62]. Dies ist von besonderer Bedeutung, da vor allem eine Punktmutation im AKT1-Gen nicht nur bei 6% der Kolorektalkarzinome, sondern auch bei 8% der Mammakarzinome und 6% der Ovarialkarzinome vorkommt und dort wiederum proliferationsfördernde und anti-apoptotische Signalwege aktiviert [88].

Ein weiteres Potential von Emodin stellt dessen Fähigkeit dar, für die Metastasierung von Tumorzellen notwendige Prozesse zu beeinflussen. Metastasierung maligner Tumore beinhaltet essentielle Vorgänge wie Adhäsion, Migration und Invasion [89]. Neuere Studien belegen die inhibitorische Wirkung von Emodin auf diese Prozesse vor allem durch die Beeinflussung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Für humane Kolorektalkarzinome konnte zumindest eine Überexpression der MMP2 nachgewiesen werden [90].

Zunächst gelang Zhu et al. der Nachweis einer inhibierten Produktion der MMP9 in Ovarialkarzinomzellen (HO-8910PM) nach einer Inkubation mit Emodin mit einem IC_{50} -Wert von 35 μ mol/l. Zusätzlich wurde eine signifikante Inhibition der Membraninvasion, Adhäsion und Migration der Tumorzellen unter Emodinbehandlung verzeichnet [91].

Huang et al. konnten bei Plattenepithelkarzinomzellen (HSC5) und Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231) ebenfalls ein vermindertes Invasionsvermögen und eine reduzierte MMP9-Aktivität beobachten. Letztere konnten sie darauf zurückführen, dass Emodin die Aktivität der für die Expression von MMP9 notwendigen Transkriptionsfaktoren AP1 (Aktivatorprotein 1) und NF- κ B reduziert [92]. Später gelang es dieser Forschungsgruppe auch, ein vermindertes Adhäsionsvermögen dieser und anderer Tumorzellen (Zervixkarzinomzellen HeLa,

Leberkarzinomzellen HepG2) durch einen emodinbedingt (Konzentration bis zu 40 μM) verminderten Cholesterolgehalt in Membranlipiden nachzuweisen [93]. Auch die EGF-induzierte Migration dieser Tumorzellen konnte durch Emodin signifikant inhibiert werden [94].

Die Invasion von Gliomzellen und Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) wurde nach Emodinzugabe ebenfalls durch verminderte MMP-Produktion (MMP9 und MMP2) gehemmt. Der zugrunde liegende Mechanismus war auch hier die Aktivitätssenkung von AP1 und NF- κB [74, 95].

Sogar eine Reduktion der Proliferation (Zellzyklusstop in der G0/G1-Phase), Migration und Invasion von Endothelzellen der Nabelvene (HUVEC) und von Hautkapillaren konnte nachgewiesen werden. Hier führte die Inhibition der MMP-Produktion zu einer verminderten Aktivierung (Phosphorylierung) des VEGF α -Rezeptors [96]. Dies bedeutet nicht nur ein Nachweis der antimetastatischen, sondern auch der antiangiogenen Wirkung von Emodin. Der antiangiogene Effekt wurde überdies für Kolonkarzinomzellen (HCT116) bestätigt, in denen die VEGF-Rezeptoraktivität durch dessen verminderte Phosphorylierung nach Emodininkubation (40 μM) inhibiert wurde [84]. In unserer Studie konnte eine Metastasierung der verabreichten Zellen makroskopisch nicht beobachtet werden. Dies war allerdings auch nicht Gegenstand der Untersuchungen.

5.3.2 Antikancerogene Wirkung von Emodin *in vivo*

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirksamkeit von Emodin und BTB14431 *in vivo*, wobei große Unterschiede zu *in vitro*-Systemen vorliegen, vor allem in der effektiv wirksamen Konzentration der Substanzen sowie der potentiellen systemischen Beeinträchtigung. So kann bei *in vitro*-Studien meist durch den unmittelbaren Kontakt der Tumorzellen zum Wirkstoff unter definierten Bedingungen dessen direkte Wirkung beurteilt werden. Bei *in vivo*-Studien wie der hier beschriebenen hingegen unterliegen sowohl der Wirkstoff als auch die applizierten Tumorzellen einer Vielzahl von Einflussfaktoren. Für die meist neuartigen Wirkstoffe sind pharmakokinetische Daten (Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion) und Kenngrößen (Verteilungsvolumen, Clearance, Bioverfügbarkeit, Plasmahalbwertszeit, Erhaltungsdosis) unbekannt. Dadurch kann vor allem bei intravenöser Anwendung der Testsubstanz die effektive Dosis am Wirkort stark von der tatsächlich applizierten Ausgangsdosis abweichen. Des Weiteren wird das Wachstum von Tumorzellen bei jedem Tier individuell beeinflusst, zum Beispiel durch die Interaktion von Tumorzellen und Organismus und die Fähigkeit des Immunsystems, Tumorzellen abzuwehren.

Nur im Rahmen der toxikologischen Studie des NTP (vgl. Kapitel 1.3.3 Charakterisierung von Emodin), bei der eine orale Applikation von Emodin erfolgte, wurde *in vivo* der Zusammenhang zwischen einer Applikation von Emodin und dem Wachstum von Kolonkarzinom- bzw. Kolorektalkarzinomzellen untersucht. Allerdings war hier das Untersuchungsziel die Induktion von Tumorwachstum und nicht dessen Suppression. Somit sind die im Folgenden beschriebenen Studien nur unter der Voraussetzung einer vergleichbaren Wirkung von Emodin auf verschiedene Tumorzelllinien direkt zu übertragen. Erstmals wurde 1999 von Zhang et al. über die Emodinbehandlung von Nacktmäusen berichtet, denen subkutan HER-2/neu-überexprimierende (MDA-MB-361, s.o.) Mammakarzinomzellen bzw. Mammakarzinomzellen mit basalen HER-2/neu-Spiegeln (MDA-MB-231) injiziert wurden. Drei Wochen später, als solide Tumore palpierbar waren, erhielten die Tiere acht Wochen lang zweimal wöchentlich Emodin intraperitoneal in einer Dosierung von 40 mg/kg und wurden über einen Zeitraum von maximal einem Jahr beobachtet. Während die Emodinbehandlung im Vergleich zur Placebogabe bei den Mäusen mit MDA-MB-361-Tumoren sowohl zu signifikant inhibiertem Tumorwachstum als auch zu deutlich verlängerter Überlebenszeit führte, konnten diese Effekte bei den Mäusen mit MDA-MB-231-Tumoren nicht bestätigt werden. Zudem wurden im HER-2/neu-überexprimierenden MDA-MB-361-Tumorgewebe der mit Emodin behandelten Mäuse eine reduzierte Expression von HER-2/neu und eine reduzierte Tyrosinphosphorylierungsrate verzeichnet. Nach einer Kombinationstherapie von Emodin und dem Chemotherapeutikum Taxol war ein noch geringeres Tumorwachstum bei noch längerer Überlebenszeit als nach alleiniger Emodintherapie zu beobachten [81].

Erst 2004 veröffentlichten Yang et al. die Ergebnisse einer zweiten tierexperimentellen Studie, in der Nacktmäuse nach subkutaner Injektion von Ösophaguskarzinomzellen (EC/CHUK1) 18 Tage lang täglich intraperitoneal mit Emodin in einer Dosierung von 20 bzw. 30 mg/kg behandelt und danach getötet wurden. Nebenwirkungen wie Gewichtsreduktion, Veränderungen an Lunge, Herz, Nieren, Leber und Hirn oder Todesfällen wurden bei selbst bei der höchsten Dosierung nicht beobachtet. Jedoch konnte Emodin erst in der Dosierung von 30 mg/kg eine geringgradige Reduktion des Tumorgewichtes bewirken. Ebenfalls nebenwirkungsfrei blieb eine Kombinationstherapie mit 5 mg/kg Arsenik (As_2O_3), erzielte aber ein deutlich reduzierteres Tumorwachstum als Emodin allein. Dennoch war auch hier das durchschnittliche Tumorgewicht um ein Vielfaches höher als jenes in der mit 5-FU behandelten Vergleichsgruppe, bei der jedoch deutliche Nebenwirkungen auftraten [64]. Diese Arbeitsgruppe hatte wie zuvor erwähnt in einer *in vitro*-Studie mit den gleichen Zellen eine durch Emodin induzierte Apoptose durch Aktivierung von ROS nachgewiesen. Die Ergebnisse des *in vivo*-Experiments zeigen, dass Emodin allein nur in geringem Maße Tumorwachstum supprimiert, jedoch die Kombination mit einer zelltoxischen Substanz wie

Arsenik eine Verstärkung der ROS-Erzeugung und eine Reduktion des Tumorwachstums bewirkt. Zellen verfügen über zahlreiche Mechanismen, um sich vor oxidativer Schädigung zu schützen (Glutathion-System, Chaperon-System, Hitzeschockprotein70). *In vivo* ist die oxidative Schädigung durch Emodin schwächer ausgeprägt als *in vitro*, da zum einen die effektive Konzentration geringer ist und zum anderen die Schutzmechanismen die Wirkung reduzieren. Jedoch ist die ROS-Erzeugung eine Beeinträchtigung, die nicht nur in den Tumorzellen induziert wird, sondern auch im gesamten Organismus. Dadurch kann das Wachstum von Tumoren, wie in unserem Tierexperiment, weniger effizient durch das Immunsystem inhibiert werden. Eine weitere Studie untersuchte die Wirkung von Emodin an Nacktmäusen, denen subkutan Prostatakarzinomzellen (PC3) bzw. Prostatakarzinomzellen mit für den humanen Androgenrezeptor (AR) kodierenden Genen (PC3-AR) injiziert wurden. Eine Woche später erhielten die Tiere tägliche intraperitoneale Gaben von Emodin (40 mg/kg, Zeitraum nicht angegeben). Bei den PC3-Tumoren konnte ein inhibitorischer Effekt von Emodin nicht beobachtet werden. Jedoch erfolgte ein deutlich verringertes Wachstum der PC3-AR-Tumore. Des Weiteren wurden C3(1)/SV40-transgene Mäuse, die AR-positive Prostatakarzinome entwickeln, täglich mit 40 mg/kg Emodin intraperitoneal behandelt solange diese keine erkennbaren Tumore ausbildeten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte durch diese Therapie eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit und eine Verbesserung des Allgemeinbefindens (stete Körpergewichtszunahme, besseres Fellpflegeverhalten, höhere Käfigaktivität) erreicht werden. Das Tumorgewebe dieser Tiere wies einen verminderten Gehalt von Androgenrezeptoren (AR) auf [80].

Vergleicht man nun die intraperitoneal verabreichten Dosierungen von 30 – 40 mg/kg Emodin in diesen tierexperimentellen Studien mit denen unserer Studie (5 bzw. 10 mg/kg), so wird deutlich, dass die von uns gewählten Dosierungen möglicherweise nicht ausreichten, um eine Reduktion des Tumorwachstums zu erzielen. Es sollte aber im vorliegenden Tierexperiment ein Vergleich der Ergebnisse nach intravenöser bzw. intraperitonealer Therapie möglich sein, wozu eine gleiche Dosierung Voraussetzung ist. Jedoch ergaben die im Vorfeld durch uns durchgeführten Lösungsversuche, dass es nicht möglich war, die Emodinlösung höher zu konzentrieren, da sich die pulverförmige Ausgangssubstanz in höherer Konzentration deutlich schlechter lösen ließ. Auch erschien uns eine Steigerung des Injektionsvolumens über einen Milliliter hinaus als eine zu starke Belastung für die Tiere. Einerseits hätten sich dadurch die Injektionsdauer und damit auch die Narkosedauer erheblich verlängert, andererseits waren die Folgen einer derartigen Volumenbelastung des Herzkreislaufsystems bei einem physiologischen Blutvolumen von ca. 17,5 ml bei einer Ratte mit einem Körpergewicht von 250 g [97] nicht ausreichend bekannt. Eine Wirksamkeit der von uns gewählten niedrigeren Dosierungen zumindest nach intraperitonealer Gabe konnte auch nicht von vornherein ausgeschlossen werden, da in unserer Studie im Gegensatz zu

den anderen die Testsubstanzen direkten Kontakt zu den Tumorzellen hatten. In den Tierexperimenten, bei denen Emodin intraperitoneal verabreicht wurde, war dieses meist in DMSO gelöst. In dem hier beschriebenen Tierexperiment sollten die Ergebnisse nach intravenöser und intraperitonealer Applikation vergleichbar sein, wozu die Ausgangsbedingungen, also auch die Trägerlösung, möglichst identisch sein sollten. Da DMSO jedoch intravenös appliziert toxisch wirkt, konnte es hier als Lösungsmittel nicht eingesetzt werden.

5.4 Tiergewichtsentwicklung

Der Stress durch die Allgemeinnarkose und durch die Laparotomie und die demzufolge verminderte Futteraufnahme führte zunächst zu einer Abnahme des Körpergewichtes bei allen Tieren. Die zweimal täglich erfolgten Manipulationen im Rahmen der Therapiegabe, in besonderem Maße bei den intravenös behandelten Tieren (zusätzlich Inhalationsnarkose), wirkten sich weiterhin negativ auf die Gewichtsentwicklung aus. Zusätzlich war das Allgemeinbefinden und damit das Fressverhalten der intravenös behandelten Tiere beeinträchtigt durch den implantierten Port (Fremdkörper und weitere Wunde, vgl. Kapitel 5.3 Beurteilung des Tumorwachstums) und die Allgemeinanästhesie zur Portentfernung. Nach Beendigung der Therapiegabe und damit dieser dazu notwendigen Maßnahmen erholten sich alle Tiere schnell und erreichten bis zum Zeitpunkt der Obduktion ein altersgerechtes Körpergewicht. Diese Reaktion zeigte, dass die Tiere während der Therapiezeit einer nicht unerheblichen Belastung durch die Manipulationen und höchstwahrscheinlich auch durch die Therapielösungen selbst ausgesetzt waren.

5.5 Mortalität

Alle 14 Todesfälle nach Behandlungsbeginn traten ausschließlich bei Tieren mit intravenöser Behandlung auf, wobei eines dieser Tiere (Gruppe A-Ko) unmittelbar nach der Entfernung des Portsystems verstarb. Allerdings hatte sich bei diesem Tier eine erhebliche Menge farblos-trüben und zähflüssigen Sekrets (ca. 3 ml) in der Porttasche gebildet, was auf eine inflammatorische Fremdkörperreaktion auf den Port hinweisen könnte. Es könnte ebenfalls ein manifester Abszess vorgelegen haben. Möglicherweise war das Tier dadurch so geschwächt, dass es die Belastung einer Vollnarkose nicht überlebte. Die zwei Einzelfälle der in Narkose zur Therapieinjektion verstorbenen Tiere in Gruppe A-Ko bzw. A-B1 waren eher auf eine toxische Wirkung des Inhalationsnarkosegases zurückzuführen. Mit steigender Dosierung von Emodin nahm die Anzahl, aber besonders der relative Anteil der Todesfälle in den einzelnen Therapiegruppen zu. In der Gruppe A-E1 starben fünf von zwölf behandelten

Tieren während der Emodininjektion. Im Gegensatz dazu verstarben dabei in der Gruppe A-E2 alle sechs Tiere trotz geringstmöglicher Dosierung der Inhalationsnarkose und möglichst langsamer Injektion der Therapielösung. Zwei dieser sechs Tiere verstarben am Therapietag sieben während der letzten Injektion. Dies lässt vermuten, dass Emodin ein toxisches Potential bei intravenöser Applikation über einen Zeitraum von mehreren Tagen in einer Dosierung von mindestens 5 mg/kg besitzt. Möglicherweise wurde dieses toxische Potential durch die bereits beschriebene Belastung aufgrund der notwendigen Inhalationsnarkosen noch verstärkt. Eine intravenöse Behandlung von Ratten mit 2,5 mg/kg Emodin erfolgte, hingegen mit anderer Intention, in zwei chinesischen Arbeitsgruppen. Wu et al. therapierten so Sprague-Dawley-Ratten mit induzierter akut nekrotisierender Pankreatitis alle sechs Stunden. Allerdings wurden die Tiere drei, sechs bzw. zwölf Stunden nach der ersten Injektion getötet, sofern sie nicht schon vorher an der Pankreatitis verstarben. In der Gruppe der nach 12 Stunden getöteten Ratten war die Überlebensrate bis dahin signifikant höher (56,3%) als in der Kontrollgruppe (23,8%) [82]. Zhang et al. wiederholten dieses Tierexperiment und erzielten ähnliche Ergebnisse [83]. Trotz der zunächst gesteigerten Überlebensrate durch eine offensichtlich antiinflammatorische Wirkung von Emodin, konnten in diesen Studien Auswirkungen einer längeren intravenösen Emodingabe wie in der hier vorgestellten Arbeit nicht eruiert werden. Eine intravenöse Injektion von 10 mg/kg Emodin erfolgte problemlos in einer pharmakokinetischen Studie an sechs Neuseeland-Kaninchen. Allerdings wurde hier die Injektion nur einmalig und ohne Sedierung oder Narkose durchgeführt [98].

5.6 Allgemeine Verträglichkeit von Emodin und BTB14431

Eine generell stärkere Belastung der Tiere mit intravenöser Behandlung bestätigten auch die Veränderungen des Blutbildes. Nach der Therapiewoche war hier zumindest tendenziell ein relevanter reaktiver Anstieg der Leukozyten- sowie der Thrombozytenzahlen zu verzeichnen. Alle anderen Werte wie Hämatokrit, Erythrozyten-, Lymphozyten- und Monozytenzahl sowie die Anzahl von Neutrophilen, Basophilen und Eosinophilen Granulozyten blieben nach Beendigung der Therapiegabe im Wesentlichen unverändert. Dies zeigt, dass weder Emodin noch BTB1443 in dem in dieser Arbeit vorgestellten Experiment einen myelosuppressiven Effekt bewirkten. Die Wundheilung war bei allen Tieren sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch nicht beeinträchtigt. Ein Auftreten von teils blutigem Aszites war vor allem unter den intravenös behandelten Ratten zu beobachten, die allerdings auch ein deutlich höheres intraabdominales Tumorstadium aufwiesen als die intraperitoneal behandelten. Bei Betrachtung der Einzelfälle aller Therapiegruppen war ein Aszites zu 70 % bei Tieren mit einem intraabdominalen Tumorgewicht von mehr als 0,5 g vorhanden. Dieser

Zusammenhang lässt vermuten, dass in erster Linie die induzierte Peritonealkarzinose zur Ausbildung eines blutigen Aszites führt. Reizungen des Peritoneums durch die Therapielösungen selbst oder durch zweimal tägliche Injektionen spielen eher eine untergeordnete Rolle.

Als allgemeine Indikatoren für den Gesundheitszustand der Tiere wurden während des Therapiezeitraums mindestens zweimal täglich deren Körperhaltung und Verhalten durch einen Arzt oder geschulte Tierpfleger kontrolliert. Die Kurznarkosen zur intravenösen Therapie bewirkten eine Reduktion der körperlichen Aktivität der Tiere im Behandlungszeitraum. Das Fell war leicht aufgestellt, die Tiere fraßen etwas weniger und das Erkundungsverhalten sowie das Sozialverhalten waren reduziert. Die Körperhaltung und die Atmung waren jedoch als physiologisch anzusehen. Nach Beendigung der Therapie erholten sich diese Tiere rasch. Bei den intraperitoneal therapierten Tieren waren die beschriebenen Defizite mit Ausnahme einer kurzen postoperativen Phase nicht zu beobachten.

5.7 Schlussfolgerungen

Es konnten weder nach intravenöser noch nach intraperitonealer Applikation von Emodin oder BTB14431 Effekte auf das Tumorwachstum von Kolonkarzinomzellen CC531 nachgewiesen werden. Dosisabhängig führten intravenöse Injektionen von Emodin bei 5 mg/kg zu toxischen Nebenwirkungen, die bei einer Dosierung von 10 mg/kg zu einer 100%igen Mortalität führen können. Emodin und BTB14431 sind bei intraperitonealer Applikation gut verträglich. BTB14431 ist bei intravenöser Applikation nebenwirkungsarm. Die Ergebnisse der eigenen Studie und die Ergebnisse der *in vitro* Studien von Füllbeck et al. [39] zeigen, dass neue Suchmethoden nach nebenwirkungsärmeren oder effektiveren Analoga tumorsuppressiver Substanzen erfolgreich sein könnten.

5.8 Ausblick

Zur Klärung antineoplastischer Effekte von Emodin und BTB14431 *in vivo* sind weitere Untersuchungen notwendig. Als Fortführung dieser tierexperimentellen Studie wären Tests an Tieren mit einem fortgeschrittenen CC531-Tumorwachstum denkbar, bei denen dann die antiangiogenetischen Eigenschaften der Substanzen überprüft werden könnten. Weiterhin könnten Tumormodelle untersucht werden, für die bereits *in vitro* ein reduziertes Tumorwachstum durch eine Behandlung mit Emodin nachgewiesen wurde. Von Vorteil wäre hierbei eine bereits bekannte Wirkstoffkonzentration für die jeweilige Zelllinie. Aufgrund der guten Verträglichkeit intraperitonealer Applikationen von Emodin und BTB14431 könnte

analysiert werden, ob höhere intraperitoneale Dosierungen eine bessere Inhibition des Wachstums lokaler Tumoren bewirken. Interessant wäre auch die Fragestellung, ob Substanzen wie Emodin oder BTB14431 die Wirkung bekannter Chemotherapeutika amplifizieren können. Damit wäre es möglich, Chemotherapeutika niedriger zu dosieren und somit auch deren Nebenwirkungen zu reduzieren.

6 Zusammenfassung

Der Einfluss der intraperitonealen und intravenösen Applikation von Emodin und BTB14431 in der konventionellen Chirurgie auf das intra- und extraperitoneale Tumorwachstum bei Ratten

Mit dem Ziel, die deregulierte Wachstumskontrolle und die Überlebensstrategien maligner Tumoren zu beeinflussen, stellt die Entwicklung effektiver und nebenwirkungsarmer antineoplastischer Substanzen zur Therapie maligner Tumoren einen bedeutenden Bestandteil der Forschung dar. Eine Verstärkung des tumorinhibierenden Effektes sowie die Reduktion unerwünschter Wirkungen bieten neue Perspektiven in der lokalen und systemischen Chemotherapie maligner abdominaler Tumoren. Zahlreiche *in vitro* Studien konnten nachweisen, dass Emodin, der Inhaltsstoff einiger traditioneller chinesischer Heilpflanzen, eine wichtige Rolle bei der Inhibition von Tumorprogression, -invasion und -metastasierung spielt. *In vivo* Untersuchungen belegten, dass nach oraler oder intraperitonealer Therapie mit Emodin Tumorwachstum reduziert werden konnte. Zahlreiche experimentelle Studien konnten nachweisen, dass Emodin durch Apoptose und andere intrazelluläre Wirkmechanismen Tumorwachstum signifikant reduzieren kann.

Als Grundlage für das hier vorgestellte Tierexperiment diente ein Projekt, bei dem anhand der Leitstruktur Emodin ein *in silico* Screening durchgeführt wurde, um strukturähnliche und analoge Substanzen zu finden. Dabei wurde die Substanz BTB14431 als ein weiterer möglicher Inhibitor der an das COP9-Signalosom (CSN-) assoziierten Kinasen CK2 und PKD identifiziert. Die Zugabe dieser beiden Substanzen zu den rekombinanten Kinasen oder dem aufgereinigten CSN führte zu einer Hemmung der Kinaseaktivität von PKD, CK2 und des aufgereinigten CSN-Komplexes. Nach der Zugabe von Emodin und BTB14431 zu Tumorzellen (humane Zervixkarzinomzellen-HeLa, B8 Mausfibroblasten) konnte ein vermindertes Tumorwachstum durch eine Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 und eine Destabilisierung von c-Jun gegenüber einer Ubiquitin- und Proteasom-abgängigen Proteolyse beobachtet werden.

In dieser Arbeit wurde vor dem Hintergrund einer besseren Therapiemöglichkeit des humanen kolorektalen Karzinoms mit einem standardisierten tierexperimentellen (WAG/Rij-Ratten) Tumormodell (CC531-Zellen) im Langzeitversuch die tumorsupprimierende Wirkung von Emodin und BTB14431 unter besonderer Berücksichtigung von unerwünschten Wirkungen in Abhängigkeit von Applikationsweise und Dosierung untersucht.

Die Tiere wurden in sechs intravenös und sechs intraperitoneal behandelte Therapiegruppen randomisiert. 20 Minuten nach medianer Laparotomie erfolgten eine intraperitoneale

Applikation von Kolonadenokarzinomzellen (Suspension) auf das Coecum und danach ein zweischichtiger Wundverschluss. Anschließend erfolgte eine subkutane Injektion der Tumorzellsuspension im Nackenbereich der Tiere, welche eine Fernmetastasierung darstellte. Unmittelbar anschließend wurde entsprechend der Randomisierung mit der intravenösen bzw. der intraperitonealen Therapie begonnen, die sieben Tage lang alle 12 Stunden verabreicht wurde. Bei den intravenös zu behandelnden Tieren wurde die Therapielösung über ein Portsystem während einer kurzen Inhalationsnarkose appliziert. Unmittelbar präoperativ und am Tag nach der letzten Therapiegabe wurden peripher venöse Blutentnahmen durchgeführt. Drei Wochen nach Beendigung der Therapie wurden die Tiere euthanasiert und das Tumorwachstum beurteilt.

Emodin und BTB14431 hatten in diesem Experiment keinen Einfluss auf das Wachstum von CC531-induzierten Tumoren.

Das Operationstrauma ist der größte Einflussfaktor auf den Leukozytenverlauf.

Dosisabhängig führen intravenöse Emodin-Applikationen bis zu einer vollständigen Mortalität unter WAG/Rij-Ratten. Unerwünschte Wirkungen wie Wundheilungsstörungen, gestörtes Allgemeinbefinden, vermindertes Wachstum der Tiere oder gar andauernder Gewichtsverlust oder Veränderungen des peripheren Blutbildes im Sinne einer eingeschränkten Knochenmarksfunktion wurden bei höheren Dosierungen nicht beobachtet.

Im Gegensatz zu anderen Studien wurden in diesem Experiment keine signifikanten tumorsupprimierenden Effekte nach intraperitonealer Therapie von Emodin beobachtet. Emodin und BTB14431 bleiben jedoch interessante, neuartige Substanzen, die Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein werden.

7 Summary

The influence of intraperitoneal and intravenous application of emodin and BTB14431 in conventional surgery on the intra- and extraperitoneal tumour growth in rats

The development of effective antineoplastic drugs with low side effects for treatment of malign tumours by influencing their deregulated growth control and survival strategies is a major part of current medical research. Increase of tumour inhibitory effects as well as the reduction of unwanted results yields new perspectives in the local and systemic chemotherapy of malign abdominal tumours. Numerous *in vitro* studies show that emodin, contained in several traditional Chinese medical plants, has an important place in the inhibition of tumour progression, -invasion and –metastasiation. In vivo studies demonstrated reduced tumour growth after oral or intraperitoneal application of emodin. Many experimental studies showed that emodin significantly reduces tumour growth by inducing apoptosis and other intracellular control mechanisms.

An *in silico* screening for analogue and structural similar substances of emodin was the basis for the presented animal experiment study. In the screening the anthraquinone BTB14431 was found to be a potential inhibitor of the COP9-signalosome (CSN) associated kinases CK2 and PKD. Application of both substances to the recombinant kinases or to the purified CSN resulted in a reduction of the kinase activity of PKD, CK2 and of the purified CSN complex. Treatment of tumour cell lines (human cervix carcinoma cells - HeLa, B8 murine fibroblasts) with emodin and BTB14431 yielded a reduced cell growth and a stabilisation of the tumour suppressor p53 and destabilisation of c-Jun in regard to ubiquitine - proteasome - dependent proteolysis.

This study examines the tumour suppressing effect of emodin and BTB14431 in a standardized animal experimental (WAG/Rij rats) tumour model (CC531 cells) with special consideration of unwanted side effects in regard to the route of application and dose. The goal of this long term study is a better therapy of the human colorectal cancer after surgical displacement of the tumour.

The animals were randomized into 6 groups treated intraperitoneally and 6 groups treated intravenously. A suspension of colon adenocarcinoma cells were applied to the caecum of the rats 20 minutes after a laparotomy followed by a two level closing of the wound. Afterward the tumour cell suspension was applied to the neck region subcutaneously as distant metastasing directly followed by the first application of the 7 days every 12 hours therapy according to the respective therapy groups. The intravenous application was done by usage of a port system and a short inhalation narcosis. Blood probes were taken from the

peripheral veins just before the operation and on the day after the 7 day therapy. Three weeks after the end of the therapy the animals were euthanized and the tumour growth evaluated.

Emodin and BTB14431 showed no influence on the growth of CC531 induced tumours in this experiment.

The trauma of the operation is the biggest influence on the amount of the leukocytes.

Depending on the dose the intravenous application of emodin resulted in a high up to total mortality of the WAG/Rij rats. Side effects like reduced wound healing, disturbed general condition, reduced growth, persistent weight loss, and changes of the blood count could not be observed at increased doses.

In contrast to other studies no significant tumour suppressing effects of emodin could be observed for the intraperitoneal therapy. However, emodin and BTB14431 remain interesting new substances that will be subject of further studies.

8 Literaturverzeichnis

1. Cappell, M. S. **2008**. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 37:1-24, v.
2. Schmiegel, W., C. Pox, G. Adler, W. Fleig, U. R. Folsch, P. Fruhmorgen, U. Graeven, W. Hohenberger, A. Holstege, T. Junginger, T. Kuhlbacher, R. Porschen, P. Propping, J. F. Riemann, R. Sauer, T. Sauerbruch, H. J. Schmoll, M. Zeitz, and H. K. Selbmann. **2004**. [S3-Guidelines Conference "Colorectal Carcinoma" 2004]. *Z Gastroenterol* 42:1129-1177.
3. Chlumska, A., L. Boudova, and M. Zamecnik. **2006**. Sessile serrated adenomas of the large bowel. Clinicopathologic and immunohistochemical study including comparison with common hyperplastic polyps and adenomas. *Cesk Patol* 42:133-138.
4. Robbins, D. H., and S. H. Itzkowitz. **2002**. The molecular and genetic basis of colon cancer. *Med Clin North Am* 86:1467-1495.
5. Gutt, C. N., V. Riemer, Z. G. Kim, J. Erceg, and M. Lorenz. **2001**. Impact of laparoscopic surgery on experimental hepatic metastases. *Br J Surg* 88:371-375.
6. Figueredo, A., C. Germond, J. Maroun, G. Browman, C. Walker-Dilks, and S. Wong. **1997**. Adjuvant therapy for stage II colon cancer after complete resection. Provincial Gastrointestinal Disease Site Group. *Cancer Prev Control* 1:379-392.
7. Investigators, I. M. P. A. o. C. C. T. I. **1999**. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. *J Clin Oncol* 17:1356-1363.
8. Schrag, D., S. Rifas-Shiman, L. Saltz, P. B. Bach, and C. B. Begg. **2002**. Adjuvant chemotherapy use for Medicare beneficiaries with stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 20:3999-4005.
9. Francini, G., R. Petrioli, L. Lorenzini, S. Mancini, S. Armenio, G. Tanzini, S. Marsili, A. Aquino, G. Marzocca, S. Civitelli, and et al. **1994**. Folinic acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer. *Gastroenterology* 106:899-906.
10. O'Connell, M. J., J. A. Mailliard, M. J. Kahn, J. S. Macdonald, D. G. Haller, R. J. Mayer, and H. S. Wieand. **1997**. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 15:246-250.
11. Andre, T., C. Boni, L. Mounedji-Boudiaf, M. Navarro, J. Tabernero, T. Hickish, C. Topham, M. Zaninelli, P. Clingan, J. Bridgewater, I. Tabah-Fisch, and A. de Gramont. **2004**. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350:2343-2351.
12. Bech-Otschir, D., R. Kraft, X. Huang, P. Henklein, B. Kapelari, C. Pollmann, and W. Dubiel. **2001**. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J* 20:1630-1639.
13. Wei, N., D. A. Chamovitz, and X. W. Deng. **1994**. Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* 78:117-124.

14. Mundt, K. E., J. Porte, J. M. Murray, C. Brikos, P. U. Christensen, T. Caspari, I. M. Hagan, J. B. Millar, V. Simanis, K. Hofmann, and A. M. Carr. **1999**. The COP9/signalosome complex is conserved in fission yeast and has a role in S phase. *Curr Biol* 9:1427-1430.
15. Freilich, S., E. Oron, Y. Kapp, Y. Nevo-Caspi, S. Orgad, D. Segal, and D. A. Chamovitz. **1999**. The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* 9:1187-1190.
16. Seeger, M., R. Kraft, K. Ferrell, D. Bech-Otschir, R. Dumdey, R. Schade, C. Gordon, M. Naumann, and W. Dubiel. **1998**. A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J* 12:469-478.
17. Wei, N., T. Tsuge, G. Serino, N. Dohmae, K. Takio, M. Matsui, and X. W. Deng. **1998**. The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr Biol* 8:919-922.
18. Uhle, S., O. Medalia, R. Waldron, R. Dumdey, P. Henklein, D. Bech-Otschir, X. Huang, M. Berse, J. Sperling, R. Schade, and W. Dubiel. **2003**. Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *EMBO J* 22:1302-1312.
19. Pagano, M. A., L. Cesaro, F. Meggio, and L. A. Pinna. **2006**. Protein kinase CK2: a newcomer in the 'druggable kinome'. *Biochem Soc Trans* 34:1303-1306.
20. Marklund, U., K. Lightfoot, and D. Cantrell. **2003**. Intracellular location and cell context-dependent function of protein kinase D. *Immunity* 19:491-501.
21. Rykx, A., L. De Kimpe, S. Mikhalap, T. Vantus, T. Seufferlein, J. R. Vandenheede, and J. Van Lint. **2003**. Protein kinase D: a family affair. *FEBS Lett* 546:81-86.
22. Bech-Otschir, D., M. Seeger, and W. Dubiel. **2002**. The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Cell Sci* 115:467-473.
23. von Arnim, A. G. **2003**. On again-off again: COP9 signalosome turns the key on protein degradation. *Curr Opin Plant Biol* 6:520-529.
24. Voet. **1995**. *BIOCHEMISTRY*, Kap. 33.
25. Munsch, D., R. Watanabe-Fukunaga, J. C. Bourdon, S. Nagata, E. May, E. Yonish-Rouach, and P. Reisdorf. **2000**. Human and mouse Fas (APO-1/CD95) death receptor genes each contain a p53-responsive element that is activated by p53 mutants unable to induce apoptosis. *J Biol Chem* 275:3867-3872.
26. Naumann, M., D. Bech-Otschir, X. Huang, K. Ferrell, and W. Dubiel. **1999**. COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J Biol Chem* 274:35297-35300.
27. Pollmann, C., X. Huang, J. Mall, D. Bech-Otschir, M. Naumann, and W. Dubiel. **2001**. The constitutive photomorphogenesis 9 signalosome directs vascular endothelial growth factor production in tumor cells. *Cancer Res* 61:8416-8421.

28. Hamelin, R., P. Laurent-Puig, S. Olschwang, N. Jago, B. Asselain, Y. Remvikos, J. Gironde, R. J. Salmon, and G. Thomas. **1994**. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 106:42-48.
29. Slee, E. A., D. J. O'Connor, and X. Lu. **2004**. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 23:2809-2818.
30. Bellamy, C. O. **1997**. p53 and apoptosis. *Br Med Bull* 53:522-538.
31. Soussi, T. **1996**. The p53 tumour suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today* 2:32-37.
32. te Poele, R. H., A. L. Okorokov, and S. P. Joel. **1999**. RNA synthesis block by 5, 6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) triggers p53-dependent apoptosis in human colon carcinoma cells. *Oncogene* 18:5765-5772.
33. Folkman, J. **1971**. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186.
34. Gupta, M. K., and R. Y. Qin. **2003**. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* 9:1144-1155.
35. Braumann, C., J. Tangermann, C. A. Jacobi, J. M. Muller, and W. Dubiel. **2008**. Novel anti-angiogenic compounds for application in tumor therapy - COP9 signalosome-associated kinases as possible targets. *Mini Rev Med Chem* 8:421-428.
36. Longo, R., R. Sarmiento, M. Fanelli, B. Capaccetti, D. Gattuso, and G. Gasparini. **2002**. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 5:237-256.
37. Ferrara, N. **2002**. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2:795-803.
38. Poltorak, Z., T. Cohen, and G. Neufeld. **2000**. The VEGF splice variants: properties, receptors, and usage for the treatment of ischemic diseases. *Herz* 25:126-129.
39. Fullbeck, M., X. Huang, R. Dumdey, C. Frommel, W. Dubiel, and R. Preissner. **2005**. Novel curcumin- and emodin-related compounds identified by in silico 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells. *BMC Cancer* 5:97.
40. Lipinski, C. A. **2000**. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44:235-249.
41. Berse, M. **2006**. Regulation der Stabilität der proangiogenen Transkriptionsfaktoren c-Jun, Id1 und Id3 durch das COP9-Signalosom. Dissertation Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin.
42. NTP. **2001**. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of EMODIN (CAS NO. 518-82-1) Feed Studies in F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 493:1-278.
43. Sato, M., G. Maulik, D. Bagchi, and D. K. Das. **2000**. Myocardial protection by protykin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin. *Free Radic Res* 32:135-144.

44. Srinivas, G., S. Babykutty, P. P. Sathiadevan, and P. Srinivas. **2007**. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Med Res Rev* 27:591-608.
45. van Gorkom, B. A., E. G. de Vries, A. Karrenbeld, and J. H. Kleibeuker. **1999**. Review article: anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects. *Aliment Pharmacol Ther* 13:443-452.
46. Swanbeck, G. **1966**. Interaction between deoxyribonucleic acid and some anthracene and anthraquinone derivatives. *Biochim Biophys Acta* 123:630-633.
47. Muller, L., and P. Kasper. **1995**. OTC pharmaceuticals and genotoxicity testing: the paracetamol, anthraquinone, and griseofulvin cases. *Arch Toxicol Suppl* 17:312-325.
48. Mueller, S. O., and H. Stopper. **1999**. Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1428:406-414.
49. Mueller, S. O., W. K. Lutz, and H. Stopper. **1998**. Factors affecting the genotoxic potency ranking of natural anthraquinones in mammalian cell culture systems. *Mutat Res* 414:125-129.
50. Krivobok, S., F. Seigle-Murandi, R. Steiman, D. R. Marzin, and V. Betina. **1992**. Mutagenicity of substituted anthraquinones in the Ames/Salmonella microsome system. *Mutat Res* 279:1-8.
51. Westendorf, J., H. Marquardt, B. Poginsky, M. Dominiak, and J. Schmidt. **1990**. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. *Mutat Res* 240:1-12.
52. Mori, H., N. Yoshimi, H. Iwata, Y. Mori, A. Hara, T. Tanaka, and K. Kawai. **1990**. Carcinogenicity of naturally occurring 1-hydroxyanthraquinone in rats: induction of large bowel, liver and stomach neoplasms. *Carcinogenesis* 11:799-802.
53. Siegers, C. P., E. von Hertzberg-Lottin, M. Otte, and B. Schneider. **1993**. Anthranoid laxative abuse--a risk for colorectal cancer? *Gut* 34:1099-1101.
54. Jahnke, G. D., C. J. Price, M. C. Marr, C. B. Myers, and J. D. George. **2004**. Developmental toxicity evaluation of emodin in rats and mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 71:89-101.
55. Zhang, L., C. J. Chang, S. S. Bacus, and M. C. Hung. **1995**. Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin. *Cancer Res* 55:3890-3896.
56. Chan, T. C., C. J. Chang, N. M. Koonchanok, and R. L. Geahlen. **1993**. Selective inhibition of the growth of ras-transformed human bronchial epithelial cells by emodin, a protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 193:1152-1158.
57. Yim, H., Y. H. Lee, C. H. Lee, and S. K. Lee. **1999**. Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor. *Planta Med* 65:9-13.
58. Battistutta, R., S. Sarno, E. De Moliner, E. Papinutto, G. Zanotti, and L. A. Pinna. **2000**. The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *J Biol Chem* 275:29618-29622.

59. Sarno, S., S. Moro, F. Meggio, G. Zagotto, D. Dal Ben, P. Ghisellini, R. Battistutta, G. Zanotti, and L. A. Pinna. **2002**. Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol Ther* 93:159-168.
60. Shieh, D. E., Y. Y. Chen, M. H. Yen, L. C. Chiang, and C. C. Lin. **2004**. Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells. *Life Sci* 74:2279-2290.
61. Jing, X., N. Ueki, J. Cheng, H. Imanishi, and T. Hada. **2002**. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin. *Jpn J Cancer Res* 93:874-882.
62. Su, Y. T., H. L. Chang, S. K. Shyue, and S. L. Hsu. **2005**. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 70:229-241.
63. Wang, X. J., J. Yang, H. Cang, Y. Q. Zou, and J. Yi. **2005**. Gene expression alteration during redox-dependent enhancement of arsenic cytotoxicity by emodin in HeLa cells. *Cell Res* 15:511-522.
64. Yang, J., H. Li, Y. Y. Chen, X. J. Wang, G. Y. Shi, Q. S. Hu, X. L. Kang, Y. Lu, X. M. Tang, Q. S. Guo, and J. Yi. **2004**. Anthraquinones sensitize tumor cells to arsenic cytotoxicity in vitro and in vivo via reactive oxygen species-mediated dual regulation of apoptosis. *Free Radic Biol Med* 37:2027-2041.
65. Yi, J., J. Yang, R. He, F. Gao, H. Sang, X. Tang, and R. D. Ye. **2004**. Emodin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis via generation of reactive oxygen species and inhibition of survival signaling. *Cancer Res* 64:108-116.
66. Kagedal, K., D. Bironaite, and K. Ollinger. **1999**. Anthraquinone cytotoxicity and apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. *Free Radic Res* 31:419-428.
67. Lee, H. Z. **2001**. Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *Br J Pharmacol* 134:11-20.
68. Liu, J. B., X. G. Gao, T. Lian, A. Z. Zhao, and K. Z. Li. **2003**. [Apoptosis of human hepatoma HepG2 cells induced by emodin in vitro]. *Ai Zheng* 22:1280-1283.
69. Kumar, A., S. Dhawan, and B. B. Aggarwal. **1998**. Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, IkappaB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells. *Oncogene* 17:913-918.
70. Zhang, L., and M. C. Hung. **1996**. Sensitization of HER-2/neu-overexpressing non-small cell lung cancer cells to chemotherapeutic drugs by tyrosine kinase inhibitor emodin. *Oncogene* 12:571-576.
71. Zhang, L., Y. K. Lau, L. Xi, R. L. Hong, D. S. Kim, C. F. Chen, G. N. Hortobagyi, C. Chang, and M. C. Hung. **1998**. Tyrosine kinase inhibitors, emodin and its derivative repress HER-2/neu-induced cellular transformation and metastasis-associated properties. *Oncogene* 16:2855-2863.
72. Kamei, H., T. Koide, T. Kojima, Y. Hashimoto, and M. Hasegawa. **1998**. Inhibition of cell growth in culture by quinones. *Cancer Biother Radiopharm* 13:185-188.
73. Bharti, A. C., and B. B. Aggarwal. **2002**. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 64:883-888.

74. Kim, M. S., M. J. Park, S. J. Kim, C. H. Lee, H. Yoo, S. H. Shin, E. S. Song, and S. H. Lee. **2005**. Emodin suppresses hyaluronic acid-induced MMP-9 secretion and invasion of glioma cells. *Int J Oncol* 27:839-846.
75. Deane, N. G., M. A. Parker, and R. D. Beauchamp. **2005**. Cell proliferation: a matter of time and place. *Surgery* 138:1-7.
76. Aarts, F., T. Hendriks, A. Eek, W. J. Oyen, R. P. Bleichrodt, and O. C. Boerman. **2009**. Can antibody galactosylation be used to improve radioimmunotherapy of induced peritoneal carcinomatosis of colonic origin in the rat? *Cancer Biother Radiopharm* 24:29-34.
77. de Heer, P., M. H. Sandel, G. Guertens, G. de Boeck, M. M. Koudijs, J. F. Nagelkerke, J. M. Junggeburst, E. A. de Bruijn, C. J. van de Velde, and P. J. Kuppen. **2008**. Celecoxib inhibits growth of tumors in a syngeneic rat liver metastases model for colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 62:811-819.
78. Geutskens, S. B., D. J. van den Wollenberg, M. M. van der Eb, H. van Ormondt, A. G. Jochemsen, and R. C. Hoeben. **2000**. Characterisation of the p53 gene in the rat CC531 colon carcinoma. *Gene Ther Mol Biol* 5:81-86.
79. Mels, A. K., I. Mayen, M. Egmond Mv, R. H. Beelen, S. Meijer, and C. D. Richters. **2004**. Reduction of liver metastases outgrowth by tumour antigen-pulsed dendritic cell vaccination. *Comp Hepatol* 3 Suppl 1:S54.
80. Cha, T. L., L. Qiu, C. T. Chen, Y. Wen, and M. C. Hung. **2005**. Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. *Cancer Res* 65:2287-2295.
81. Zhang, L., Y. K. Lau, W. Xia, G. N. Hortobagyi, and M. C. Hung. **1999**. Tyrosine kinase inhibitor emodin suppresses growth of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells in athymic mice and sensitizes these cells to the inhibitory effect of paclitaxel. *Clin Cancer Res* 5:343-353.
82. Wu, J. X., J. Y. Xu, and Y. Z. Yuan. **2000**. Effect of emodin and sandostatin on metabolism of eicosanoids in acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 6:293-294.
83. Zhang, X. P., Z. F. Li, X. G. Liu, Y. T. Wu, J. X. Wang, K. M. Wang, and Y. F. Zhou. **2005**. Effects of emodin and baicalein on rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 11:2095-2100.
84. Lu, Y., J. Zhang, and J. Qian. **2008**. The effect of emodin on VEGF receptors in human colon cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm* 23:222-228.
85. Gheuens, E., S. van der Heyden, H. Elst, A. Eggermont, A. Van Oosterom, and E. De Bruijn. **1993**. Multidrug resistance in rat colon carcinoma cell lines CC531, CC531mdr+ and CC531rev. *Jpn J Cancer Res* 84:1201-1208.
86. Lin, S. Y., W. W. Lai, C. C. Ho, F. S. Yu, G. W. Chen, J. S. Yang, K. C. Liu, M. L. Lin, P. P. Wu, M. J. Fan, and J. G. Chung. **2009**. Emodin induces apoptosis of human tongue squamous cancer SCC-4 cells through reactive oxygen species and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Res* 29:327-335.
87. Srinivas, G., R. J. Anto, P. Srinivas, S. Vidhyalakshmi, V. P. Senan, and D. Karunagaran. **2003**. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells

- through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. *Eur J Pharmacol* 473:117-125.
88. Carpten, J. D., A. L. Faber, C. Horn, G. P. Donoho, S. L. Briggs, C. M. Robbins, G. Hostetter, S. Boguslawski, T. Y. Moses, S. Savage, M. Uhlik, A. Lin, J. Du, Y. W. Qian, D. J. Zeckner, G. Tucker-Kellogg, J. Touchman, K. Patel, S. Mousses, M. Bittner, R. Schevitz, M. H. Lai, K. L. Blanchard, and J. E. Thomas. **2007**. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448:439-444.
 89. Woodhouse, E. C., R. F. Chuaqui, and L. A. Liotta. **1997**. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80:1529-1537.
 90. Grigioni, W. F., A. D'Errico, M. Fiorentino, P. Baccharini, M. Onisto, C. Caenazzo, W. G. Stetler-Stevenson, S. Garbisa, and A. M. Mancini. **1994**. Gelatinase A (MMP-2) and its mRNA detected in both neoplastic and stromal cells of tumors with different invasive and metastatic properties. *Diagn Mol Pathol* 3:163-169.
 91. Zhu, F., X. G. Liu, and N. C. Liang. **2003**. [Effect of emodin and apigenin on invasion of human ovarian carcinoma HO-8910PM cells in vitro]. *Ai Zheng* 22:358-362.
 92. Huang, Q., H. M. Shen, and C. N. Ong. **2004**. Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB. *Biochem Pharmacol* 68:361-371.
 93. Huang, Q., H. M. Shen, G. Shui, M. R. Wenk, and C. N. Ong. **2006**. Emodin inhibits tumor cell adhesion through disruption of the membrane lipid Raft-associated integrin signaling pathway. *Cancer Res* 66:5807-5815.
 94. Huang, Q., H. M. Shen, and C. N. Ong. **2005**. Emodin inhibits tumor cell migration through suppression of the phosphatidylinositol 3-kinase-Cdc42/Rac1 pathway. *Cell Mol Life Sci* 62:1167-1175.
 95. Lu, H. F., K. C. Lai, S. C. Hsu, H. J. Lin, C. L. Kuo, C. L. Liao, J. S. Yang, and J. G. Chung. **2009**. Involvement of Matrix Metalloproteinases on the Inhibition of Cells Invasion and Migration by Emodin in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Neurochem Res*.
 96. Kwak, H. J., M. J. Park, C. M. Park, S. I. Moon, D. H. Yoo, H. C. Lee, S. H. Lee, M. S. Kim, H. W. Lee, W. S. Shin, I. C. Park, C. H. Rhee, and S. I. Hong. **2006**. Emodin inhibits vascular endothelial growth factor-A-induced angiogenesis by blocking receptor-2 (KDR/Flk-1) phosphorylation. *Int J Cancer* 118:2711-2720.
 97. TVT - Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V., D. W. N. D. H. **1995**. Hinweise zur Blutentnahme bei kleinen Versuchstieren.
 98. Liang, J. W., S. L. Hsiu, P. P. Wu, and P. D. Chao. **1995**. Emodin pharmacokinetics in rabbits. *Planta Med* 61:406-408.

9 Anhang

9.1 Übersicht über in vitro Studien - Emodin inhibiert das Zellwachstum

Zelllinie	Konzentration	Ergebnis	Bemerkungen	Autor / Jahr
v-ras-transformierte Bronchialepithelzellen	4 µg/ml (14,8 µM)	- Zellwachstum halbmaximal reduziert (Unterbrechung des Zellzyklus in Phase G2/M) - Emodin fungiert als Tyrosinkinaseinhibitor	- Effekt nicht bei normalen Bronchialepithelzellen selbst bei einer Konzentration von 100 µg/ml (v-ras-transformierten Zellen: erhöhter Gehalt an bestimmten Phosphotyrosin-haltigen Proteinen)	Chan / 1993 [56]
HER-2/neu überexprimierendes Mammakarzinom (MDA-MB453, BT-483, AU-565, MDA-MB-361)	40 µM	- Zellwachstum reduziert im Vergleich zur Kontrolle (durch Fortschreiten der Zelldifferenzierung) - Emodin fungiert als Tyrosinkinaseinhibitor	- Auto- und Transphosphorylierungsaktivitäten der HER-2/neu-Tyrosinkinase p185neu (Rezeptor für Wachstumsfaktoren) supprimiert - Effekt nicht bei Zellen mit basalen p185neu-Levels (Brustkrebszellen MDA-MB231, MCF-7 als auch die immortalisierten Brustzellen HBL-KX)	Zhang / 1995 [55]
Kolonkarzinom (HCT-15)	12,5 µg/ml (46,3 µM)	50%ige Suppression des Zellwachstums (Unterbrechung des Zellzyklus in Phase G1/S)		Kamei / 1998 [72]
Hepatozelluläres Karzinom (HepG2/C3A)	60 µM	Unterbrechung des Zellzyklus in der G2/M Phase		Shieh / 2004 [60]
Kolonkarzinom (HCT-116)	40 µM	Unterbrechung des Zellzyklus in der G2/M-Phase	Zusätzliche Effekte: - Apoptoseauslösung - Inhibition von VEGF-Rezeptorphosphorylierung (antiangiogenetische Wirkung) - antiangiogener Effekt: reduzierte VEGF-Rezeptoraktivität durch dessen verminderte Phosphorylierung nach Emodininkubation	Lu / 2008 [84]

9.2 Übersicht über in vitro Studien - Emodin löst Apoptose aus

Zelllinie	Konzentration	Ergebnis	Bemerkungen	Autor / Jahr
Pulmonales Plattenepithelkarzinom(CH27) Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (H460)	50 µM	Apoptose durch Aktivierung von ROS		Lee / 2001 [67]
Hepatozelluläres Karzinom (HepG2/C3A, PLC/PRF/5, Mahlavu)	20 µg/ml (74 µM)	Apoptose durch Aktivierung von ROS	Zerstörung von Mitochondrien, Freisetzung von Cytochrom c und anschließende Aktivierung der Kaspasen 3 und 9 induziert durch ROS	Jing / 2002 [61]
Zervixkarzinom (HeLa, Ca Ski, ME-180, BU25TK)	50 µM	Apoptose durch Aktivierung von ROS		Srinivas / 2003 [87]
Ösophaguskarzinom (EC/CUHK1)	10 µM	Apoptose durch Aktivierung von ROS	Effekt verstärkt durch Arsenik	Yang / 2004 [64]
Hepatozelluläres Karzinom (HepG2/C3A, PLC/PRF/5, SK-HEP-1)	42.5 µM 46.6 µM 53.1 µM	Apoptose (jeweils IC ₅₀ -Werte)	signifikanter Anstieg proapoptotischer Faktoren wie p53, p21, Fas und Kaspase3	Shieh / 2004 [60]
Adenokarzinom der Lunge (A549)	50 µM	Apoptose durch Aktivierung von ROS	Inaktivierung von - ERK (Extracellular-signal Regulated Kinases) aus der Familie der MAP-Kinasen - für die Proteinkinasen Bcr/βγ kodierenden AKT-Genen	Su / 2005 [62]
- Zervixkarzinom (HeLa) - B8-Maus-Fibroblasten	20 µM 50 µM 100 µM	Apoptose (je höher Konzentration, desto mehr)	mit steigender Konzentration steigender - Anstieg der intrazellulären Konzentration von p53 - Abfall der intrazellulären Konzentration von c-Jun	Füllbeck / 2005 [39]
Plattenepithelkarzinom der Zunge (SCC-4)	50 µM	Apoptose durch Aktivierung von ROS	- zusätzlich Unterbrechung des Zellzyklus in der G2/M Phase - erhöhte Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien und Aktivierung der Kaspasen 3 und 9	Lin / 2009 [86]

9.3 Übersicht über in vitro Studien - Emodin hemmt Metastasierung

Zelllinie	Konzentration	Ergebnis	Bemerkungen	Autor / Jahr
Ovarialkarzinom (HO-8910PM)	35 µM (IC ₅₀ -Wert)	Inhibition der Membraninvasion, Adhäsion und Migration	inhibierte Produktion der MMP9	Zhu / 2003 [91]
Plattenepithelkarzinom (HSC5) Mammakarzinom (MDA-MB-231)	nicht angegeben	vermindertes Invasionsvermögen	reduzierte MMP9-Aktivität (für Expression von MMP-9 notwendige Transkriptionsfaktoren AP1 und NF-κB reduziert aktiviert)	Huang / 2004 [92]
Plattenepithelkarzinom (HSC5) Mammakarzinom (MDA-MB-231) Zervixkarzinom (HeLa) Leberkarzinom (HepG2)	bis zu 40 µM	vermindertes Adhäsionsvermögen (1) EGF-induzierte Migration inhibiert (2)	verminderten Cholesterolgehalt in Membranlipiden durch Emodin	Huang / 2006 (1) [93] Huang / 2005 (2) [94]
Endothelzellen der Nabelvene (HUVEC) und von Hautkapillaren	50 (75) µM	Reduktion der Proliferation (Zellzyklusstop in der G0/G1-Phase), Migration und Invasion	durch Inhibition der MMP-Produktion verminderte Aktivierung (Phosphorylierung) des VEGFα-Rezeptors	Kwak / 2006 [96]
Gliom Neuroblastom (SH-SY5Y)	nicht angegeben	Inhibition der Invasion	durch verminderte MMP-Produktion (MMP9 und MMP2) infolge einer Aktivitätssenkung von AP1 und NF-κB	Kim / 2005 [74] Lu / 2009 [95]

9.4 Übersicht über in vivo Studien mit Emodin

Tiere	Zelllinie	Dosis	Ergebnis	Bemerkungen	Autor / Jahr
Nacktmäuse	Mammakarzinomzellen - MDA-MB-361 (HER-2/neu-überexprimiert) - MDA-MB-231 (basale HER-2/neu-Spiegel)	8 Wochen 2x / Woche 40 mg/kg i.p.	- MDA-MB-361: reduziertes Tumorgewicht, Verlängerung der Überlebenszeit, reduzierte Expression von HER-2/neu und eine reduzierte Tyrosinphosphorylierungsrate - MDA-MB-231: kein Unterschied zur Kontrollgruppe	MDA-MB-361: nach Kombinationstherapie mit dem Chemotherapeutikum Taxol noch geringeres Tumorstadium bei noch längerer Überlebenszeit als nach alleiniger Emodintherapie	Zhang / 1999 [81]
Nacktmäuse	Ösophaguskarzinomzellen (EC/CHUK1)	18 Tage 1x täglich 20 bzw. 30 mg/kg i.p.	erst bei 30 mg/kg: geringgradige Reduktion des Tumorgewichtes	nach Kombinationstherapie mit 5 mg/kg Arsenik (As ₂ O ₃) deutlich reduzierteres Tumorstadium als nach Emodin allein	Yang / 2004 [64]
Nacktmäuse	Prostatakarzinomzellen - PC3 - PC3-AR (mit für den humanen Androgenrezeptor -AR-kodierenden Genen)	täglich 40 mg/kg i.p. Zeitraum nicht angegeben	- PC3: kein Unterschied zur Kontrollgruppe - PC3-AR: deutlich verringertes Tumorstadium		Cha / 2005 [80]
C3(1)/SV40-transgene Mäuse	(Tiere entwickeln AR-positive Prostatakarzinome)	täglich 40 mg/kg i.p. bis Tumore erkennbar ausgebildet	Verlängerung der Überlebenszeit, Verbesserung des Allgemeinbefindens, verminderter Gehalt von Androgenrezeptoren (AR) im Tumorgewebe dieser Tiere		Cha / 2005 [80]
Nacktmäuse	humane Gliomzellen	täglich 50 mg/kg p.o.	reduzierte Sekretion von MMP-9	Einzelheiten unbekannt (chinesische Originalliteratur nicht übersetzt)	Kim / 2005 [74]

Danksagung

Herrn PD. Dr. med. Chris Braumann danke ich für die Überlassung des Themas, die vertrauensvolle Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein freundschaftliches Engagement, seine fortwährende Unterstützung bei der Planung und Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten, bei der Auswertung der Ergebnisse und bei der Erstellung meiner Dissertation.

Für die freundliche Arbeitsatmosphäre und angenehme Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe PD Dr. Braumann herzlichst bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Stephan Rogalla für die Unterstützung bei der Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten sowie der Einführung in die Datenverarbeitung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Kirsten Führer und Frau Bettina Müller für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre tatkräftige Unterstützung bei der Einführung in die notwendigen Labortechniken, der Bereitstellung der chirurgischen Instrumentarien, der Tierpflege und bei der Lösung auftretender Probleme.

Ich danke Herrn PD Dr. med. Andreas Lun (Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité) für die Auswertung der zahlreichen Blutproben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Heidrun Fink für die kompetente Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin, die freundliche Unterstützung und ihr Verständnis bei der Fertigstellung der Arbeit.

Frau Dr. Karin Böhme danke ich für die Motivation zu dieser Arbeit.

Sascha – danke für deine unermüdliche Unterstützung bei inhaltlichen und formalen Fragen in jeder Phase dieser Arbeit, deine wertvolle und produktive Kritik, deinen Optimismus und deine Motivation in schwierigen Zeiten und Deine unermessliche Geduld mit mir. Ohne dich wäre diese Arbeit sicher nicht zustande gekommen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir eine umfassende schulische Ausbildung und das Veterinärmedizinstudium ermöglichten, stets Vertrauen in mich hatten und mich während dieser Zeit motiviert und unterstützt haben.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Jana Pohlenz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift selbstständig angefertigt und keine anderen als die in der Literaturübersicht angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Jana Pohlenz

Berlin, den

Unterschrift