

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

DISSERTATION

Der Einfluss der intraoperativen Applikation von Taurolin / Heparin, Intergel und Interceed auf das lokale und peritoneale Tumorwachstum sowie die Expression der Adhäsionsmoleküle CD44, Beta-1-Integrin und E-Cadherin bei offen-chirurgischer Intervention in einem Kolonkarzinommodell bei Ratten.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Nils Witte
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Chr. A. Jacobi

2. Prof. Dr. med. H.-P. Bruch

3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Ordemann

Datum der Promotion: 16.05.2010

Abstract

The local recurrence rate has been a common problem after surgical intervention in malignant tumours. Intraoperative, intraperitoneal instillation of anti-adherent and cytotoxic substances causes a reduction of intraperitoneal tumour growth after bowel resection of colon carcinoma in a rat model.

After intraperitoneal application of colon adenocarcinoma cells (DHD/K12/TRb) an open cecum resection was performed in 60 BD IX rats. Following randomization in 4 groups, the cecum suture and a peritoneal defect were either covered with Interceed, Intergel, taurolidine/heparin or NaCl solution. After 4 weeks the animals were euthanized, intraperitoneal tumour growth was determined. The anastomosis and the metastases were stained immunohistochemically. Intraperitoneal therapy with taurolidine/heparin inhibits intraperitoneal tumour growth as well as the expression of tumour-associated adhesion molecules. Interceed and Intergel did not have a significant suppressive effect on intraperitoneal tumour growth.

Inhaltsverzeichnis

ABSTRACT	3
INHALTSVERZEICHNIS	4
EINLEITUNG	7
Kolorektales Karzinom - Epidemiologie	7
Untersuchte Substanzen	9
Intergel®	9
Interceed™	10
Taurolidin / Heparin	10
Gemessene Moleküle	12
CD44	12
β ₁ -Integrin	13
E-Cadherin	15
MATERIAL UND METHODEN	18
Tiere und Tierhaltung	18
Zelllinie und Tumormodell	18
Eingriff	19
Randomisierung	21
Obduktion	22
Histologie und Immunhistochemie	22
Hämatoxylin/Eosin-Färbung:	24
PAS-Reaktions-Färbung:	24
Immunhistochemie:	25
Nachweis von β ₁ -Integrin	30
Nachweis von CD44	31
Chromogenreaktion	32
Nachweis von E-Cadherin	32
Mikroskopische Untersuchung	35
ERGEBNISBESCHREIBUNG	38
4	

Allgemeines	38
Makroskopische Auswertung	38
Lokalrezidive	38
Therapiegruppe Intergel®	38
Therapiegruppe Interceed™	38
Therapiegruppe Taurolidin / Heparin	38
Kontrollgruppe	38
Intraperitoneale Metastasen	39
Therapiegruppe Intergel	39
Therapiegruppe Interceed	39
Therapiegruppe Taurolidin / Heparin	39
Kontrollgruppe	39
Histochemische Untersuchungen	43
Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte	43
Untersuchung der PAS-gefärbten Schnitte	44
Untersuchung der Fibrin-Nachweise	45
Immunhistochemische Untersuchungen	47
Messung von CD44 auf dem Epithel der Kolonanastomosen	47
Messwertverteilung	48
Messung von β_1 -Integrin auf dem Epithel der Kolonanastomosen	50
Messwertverteilung	51
Messung von E-Cadherin auf dem Epithel der Kolonanastomosen	53
Messwertverteilung	55
Messung von CD44 auf dem Epithel der Metastasen	58
Messwertverteilung	59
Messung von β_1 -Integrin auf dem Epithel der Metastasen	61
Messwertverteilung	62
Messung von E-Cadherin auf dem Epithel der Metastasen	64
Messwertverteilung	65
DISKUSSION	68
Der Einfluss von Intergel®	68
Makroskopische Auswertung	68
CD44	68
β_1 -Integrin	69
E-Cadherin	69

Der Einfluss von Interceed™	70
Der Einfluss von Taurolidin / Heparin	70
Makroskopische Tumorreduktion	70
CD44 auf dem Epithel der Metastasen	72
CD44 auf dem Epithel der Darmanastomose	73
β ₁ -Integrin auf dem Epithel der Metastasen	73
β ₁ -Integrin auf dem Epithel der Darmanastomose	74
E-Cadherin auf dem Epithel der Metastasen	75
E-Cadherin auf dem Epithel der Darmanastomose	77
ZUSAMMENFASSUNG	79
Intergel®	80
Interceed™	81
Taurolidin / Heparin	81
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	83
LITERATURNACHWEIS	84
LEBENS LAUF	104
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	105
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	106

Einleitung

Kolorektales Karzinom - Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist weltweit mit einer jährlichen Inzidenz von etwa einer Million die dritthäufigste Krebsart unter Frauen und die vierthäufigste unter Männern. Männer erkranken etwa 1,2x häufiger als Frauen. Pro Jahr sterben über eine halbe Million Menschen an dieser Erkrankung. Die Fünfjahresüberlebensrate nach Diagnosestellung beträgt in den USA 65%, in Westeuropa 54%. Nach dem Mammakarzinom hat das kolorektale Karzinom mit 11,5% die zweithöchste Prävalenz^{1,2}.

Zwischen 1960 und 1980 hat sich die Inzidenz verdoppelt, seit Mitte der achtziger Jahre nimmt die Neuerkrankungsrate zumindest nicht weiter zu³⁻⁵. Das Lebenszeitrisiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, liegt etwa bei 4-6%, an einem solchen Tumor zu sterben bei etwa 2.5-3⁶⁻⁹. Etwa 90% aller Krebstodesfälle beruhen auf der Ausbildung von Metastasen¹⁰. Neben den dramatischen Auswirkungen für den einzelnen Patienten und sein soziales Umfeld ist es bei einer derart häufigen und schweren Erkrankung nicht unethisch, auch die verheerenden gesundheitsökonomischen und volkswirtschaftlichen Auswirkungen dieser Erkrankung im Blick zu behalten.

Die Drei- und Fünfjahresüberlebensrate ist in erheblichem Maße abhängig von dem Auftreten postoperativer Rezidive. Eine aktuelle Studie zeigt Dreijahresüberlebensraten von 33,1% respektive Fünfjahresüberlebensraten von 19,7% bei Auftreten von Rezidiven nach kurativer chirurgischer Intervention, während die Überlebensraten nach

drei Jahren bei 92,8% respektive 86,1% nach fünf Jahren bei Fehlen von Rezidiven liegen¹¹. Das Risiko, an einem Rezidiv zu erkranken ist bei Vorliegen eines primären Tumorstadiums von II oder III höher als 40%^{12,13}. Bei laparoskopischen Operationen wurde zunächst der erhöhte intraabdominelle Druck und das Kohlendioxid verantwortlich gemacht, doch hat man diese Einflussfaktoren heute nicht mehr als Hauptursache im Blick¹⁴⁻²⁴. Ein weitaus bedeutsamerer Mechanismus für die Ausbildung von Rezidiven ist die intraoperative Tumorzellverschleppung durch Manipulation und Traumatisierung am Tumor durch den Chirurgen, durch Eröffnung der den Tumorbezirk drainierenden venösen oder lymphatischen Gefäße. Die freigesetzten Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, an Peritonealserosa zu adhären und Metastasen zu bilden.²⁵

Die operative Entfernung eines lokal begrenzten Tumors ist nach wie vor der einzige kurative Ansatz der Therapie des kolorektalen Karzinoms. Eine entscheidende Rolle für die Möglichkeit zur intraoperativen, intraperitonealen Metastasierung von kolorektalen Karzinomen spielt die Frage, ob und wie sich verschleppte Tumorzellen an das Peritoneum anheften können. Für den Chirurgen ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung, ob durch intraoperative Einflussnahme auf die Adhäsionsfähigkeit entweder des Peritoneums oder der Tumorzellen die Rezidivrate verringert werden kann. Eine Reihe unterschiedlicher Herangehensweisen um auf die Adhäsivität des Peritoneums und/oder der Tumorzellen einzuwirken wurden und werden derzeit experimentell und klinisch untersucht²⁶⁻³¹. Größere Erfahrungen auf diesem Gebiet stammen aus dem Bereich der gynäkologischen Chirurgie, wo peritoneale und pelvine Adhäsionenbildung schon früh als bedeutender Faktor für die

Entstehung von Infertilität nach Bauch- oder Unterbaucheingriffen identifiziert werden konnte.

Grundsätzlich lassen sich mechanische Barrieren und biochemische Adhäsionsinhibitoren unterscheiden. Die Untersuchung drei ausgesuchter Substanzen sind Gegenstand dieser Arbeit.

Untersuchte Substanzen

Intergel®

Intergel® ist eine in der gynäkologischen Chirurgie zur Verhinderung von postoperativen Adhäsionen etablierte Substanz. Dieses Produkt wurde von 1998 bis 2003 erfolgreich eingesetzt und im April 2003 aufgrund schwerer Nebenwirkungen vom Hersteller Gynecare freiwillig vom Markt genommen. Es handelt sich um eine stark visköse Gelzubereitung aus eisengebundenen Hyaluronsäuremolekülen, deren antiadhäsive Eigenschaft auf der mechanischen Barriere durch das visköse Gel zu erklären ist. Darüber hinaus ist Hyaluronsäure der natürliche Ligand von CD44, was in ihrer Funktion als interzellulärer Kittsubstanz bedeutsam ist. Hyaluronsäure ist ein Polysaccharid, das in gleichen Anteilen aus Acetylglucosamin und Glucuronsäure aufgebaut ist und den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix darstellt. Durch die pharmazeutische Zubereitung als Eisenverbindung erlangt Intergel eine höhere in-situ-Halbwertszeit und dadurch eine längere Verweildauer am Wirkort, was zu einer erhöhten antiadhäsiven Wirkung führt. Die Effektivität von Intergel® wurde in mehreren klinischen und experimentellen Studien nachgewiesen^{25,28,32,33}. Ob Intergel® einen Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen hat, wurde bislang nicht untersucht.

Interceed™

Interceed™ ist ein Präparat aus bioresorbierbarer, oxidiertes, regeneriertes Zellulose, welches bei laparotomischen Operationen in den Wundbereich gelegt wird, um postoperativen Verklebungen vorzubeugen. Einziger bis dato bekannter Wirkmechanismus besteht in der Ausbildung einer temporären mechanischen Barriere zwischen den potentiell adhäsiven peritonealen und intraperitonealen Strukturen. Der Einsatzbereich erstreckt sich auf die Bauch- und Beckenchirurgie. Das Präparat ist bereits gut untersucht, die Effektivität in einer Reihe von Review-Artikeln bestätigt³⁴⁻⁵⁰. Ein möglicher Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen erscheint auf den ersten Blick nicht zu erwarten, wurde jedoch noch nie untersucht.

Taurolidin / Heparin

Taurolidin wird aus der natürlich vorkommenden Aminosäure Taurin synthetisiert. Es wird bereits seit langem erfolgreich in der Prophylaxe und Therapie mittelschwerer und schwerer Peritonitiden eingesetzt⁵¹⁻⁶⁰. Dabei macht man sich zytotoxische, antitoxische und antiadhäsive Eigenschaften der Substanz, welche alle drei auf der Fähigkeit zur Übertragung von aktivierten Methylolgruppen beruhen, zu nutzen. In wässriger Lösung liegt Taurolidin im Gleichgewicht mit Taurultam und Methyloltaurultam vor⁶¹. Taurolidin wird dabei durch enzymatische Hydrolyse in die beiden Metabolite gespalten. In einer zweiten Reaktion wird Taurultam dann in Methyloltaurinamid gespalten, was den eigentlichen Methylolgruppendonator darstellt und schlussendlich zu Taurin abgebaut wird (siehe Abbildung 1).

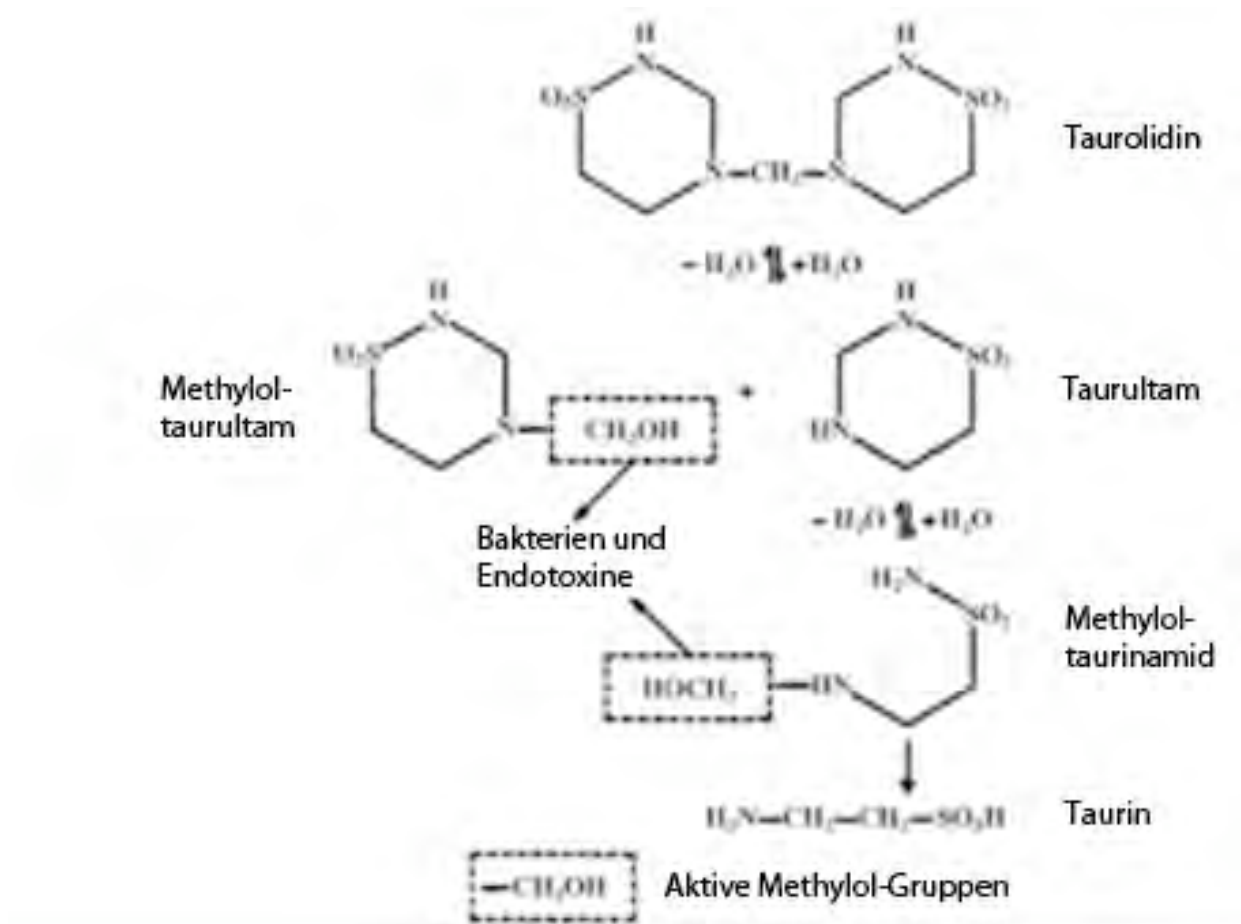


Abbildung 1: Stoffwechsel von Taurolidin

Später erkannte man, dass insbesondere die adjuvante, lokale, intraperitoneale Applikation von Taurolidin zusätzlich zur laparoskopischen oder konventionellen Tumorchirurgie suppressierend auf Tumorwachstum und Metastasierung von kolorektalen Karzinomen wirkt^{28,61-70}. Auch bei der Therapie anderer maligner Neoplasien wie Hirntumoren, Melanomen, Prostata- und Pankreaskarzinomen hat sich Taurolidin als wirksam erwiesen^{28,61-70}. Neben der bereits nachgewiesenen inhibitorischen Wirkung auf die Produktion von proliferationsstimulierendem Interleukin-1 β durch Peritonealmakrophagen⁷¹ konnte nachgewiesen werden, dass Taurolidin zumindest bei Adenokarzinomzellen der Ratte selektiv Apoptose und nicht Nekrose induziert^{64,72}.

Aufgrund der gleichzeitig bestehenden antiadhäsiven Wirkung sowohl auf Mikroorganismen als auch auf Tumorzellen^{73,74} stellt sich die Frage, über welchen molekularen Mechanismus dieser Einfluss ausgeübt wird. Eine Möglichkeit wäre eine Veränderung der Expression von Adhäsionsmolekülen. Dies wurde bislang nicht untersucht.

Gemessene Moleküle

CD44

CD44 ist eine ganze Familie isoformer transmembranöser Glykoproteine welche durch alternatives Splicing zehn unterschiedlichen Exons (v1-v10) der prä-mRNA zur mRNA im Rahmen der Proteinbiosynthese aus einem einzigen Gen mit insgesamt zwanzig Exons entstehen. Während die kleinste Isoform (CD44s) ubiquitär vorhanden ist, kommen die grösseren Isoformen massgeblich auf proliferierenden Zellen und einigen Malignomzellen vor⁷⁵. Ursprünglich war nur die physiologische Bedeutung als Mediator beim Lymphozyten-Homing in peripheren lymphatischen Geweben bekannt. Später wurde jedoch die besondere pathologische Bedeutung in seiner Schlüsselrolle bei der Metastasierung solider Tumoren erkannt⁷⁶⁻⁹⁰. Darüber hinaus hat CD44 eine Bedeutung in der zur Apoptose führenden Signaltransduktion⁹¹. Es ist bekannt, dass CD44 in Kolonkarzinomzelllinien meistens, jedoch nicht immer überexprimiert vorliegt⁹¹. Teilweise können anhand des Expressionsmusters dieses Moleküls prognostische Aussagen zur Entdifferenzierung und Invasivität^{92,93} und zur Metastasierungsneigung^{76,93-97} getroffen werden, was sich im klinischen Gebrauch allerdings noch nicht durchgesetzt hat. Ob durch eine der drei untersuchten Behandlungsformen Einfluss auf die

Expression dieses bedeutenden Adhäsionsmoleküls genommen werden kann, wurde bislang noch nicht experimentell untersucht.

β_1 -Integrin

Es handelt sich um die β_1 -Untereinheit der heterodimeren Integrin-Rezeptorfamilie. Es gibt mindestens achtzehn α - und acht β -Untereinheiten, die in mindestens 24 Permutationen auftreten und jeweils für spezielle Ligandenbindungen und Signaltransduktionen verantwortlich sind⁹⁸. Die Integrinketten haben ein Molekulargewicht zwischen 100 und 200kDa und mit Ausnahme der β_4 -Kette alle nur eine kurze zytoplasmatische Domäne. Sie vermitteln die Verankerung einer Zelle in der Extrazellulärmatrix in Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen. Charakteristisch für diese Rezeptorfamilie ist die Kopplung zwischen Zytoskelett und Signaltransduktion.

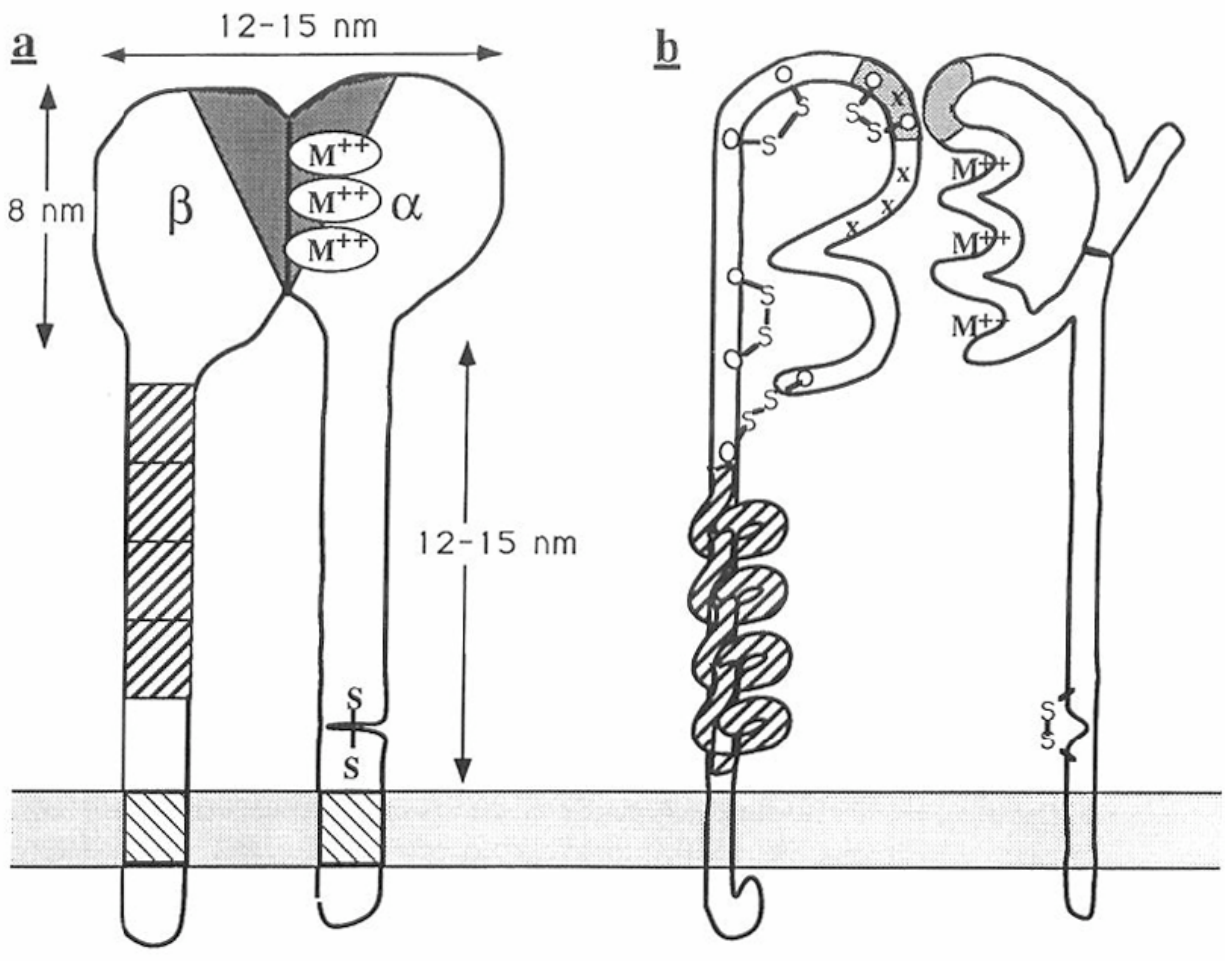


Abbildung 2: Struktur der Integrin-Rezeptoren.

(a) zeigt die Form, wie sie sich unter dem Elektronenmikroskop zeigt. Metallbindungsstellen (M^{++}), cystinreiche Repeats (quergestreift). Die grau dargestellte Region ist die Ligandenbindungsstelle.

(b) zeigt die durch Disulfidbrücken vermittelte Tertiärstruktur. Mutationen (x), Alternative splicing regions (grau)⁹⁸

Störungen der Extrazellulärmatrix wie Kollaps der Filamente führen unter anderem über diese Rezeptoren zu einer Reaktion der Zelle. Physiologischerweise nehmen Integrine an der Zelldifferenzierung, der Regulierung von Survival und Apoptose, dem Zellzyklus sowie dem Rolling und der Diapedese von Leukozyten sowie einer Vielzahl anderer Prozesse teil⁷⁷.

Obwohl experimentell ein Zusammenhang zwischen einer veränderten Expression bestimmter Untereinheiten und der Metastasierungsneigung eines Tumors gezeigt werden kann^{99,100}, hat die Messung für den klinischen Gebrauch noch keine prognostische Bedeutung erlangt. Es konnte jedoch zumindest beim malignen Melanom eine Korrelation zwischen Patientenprognose und Expression dargestellt worden¹⁰¹.

Das Verhalten der Expression dieses Moleküls nach einer der drei untersuchten Behandlungsmethoden liefert wichtige Informationen zum Verständnis der Pathogenese von Tumormetastasierung und stellt einen weiteren Schritt auf dem Weg zur Findung neuer Therapieoptionen dar.

E-Cadherin

Cadherine vermitteln kalziumabhängige Zell-Zell-Interaktionen. Beim Menschen wurden mittlerweile über achtzig Cadherine identifiziert. Allen einzelnen ist gemeinsam, dass die extrazellulär gelegenen Ektodomänen negativ geladene Sequenzmotive besitzen, welche kalziumabhängige, homophile Bindungen vermitteln. Die Überbrückung des extrazellulären Raumes erfolgt über cis-trans-Dimerisierungen mit der Ektodomäne eines Cadherins der gegenüberliegenden Zelle. Intrazellulär vermitteln Interaktionspartner wie Catenin die Verbindung mit dem Aktinfilamentsystem und stellen dadurch die Stabilität von Geweben sicher^{102,103}. Elektronenmikroskopisch lassen sich Verbände dieser Verbindungen als sogenannte Junctiones adhaerentes resp. tight junctions darstellen.

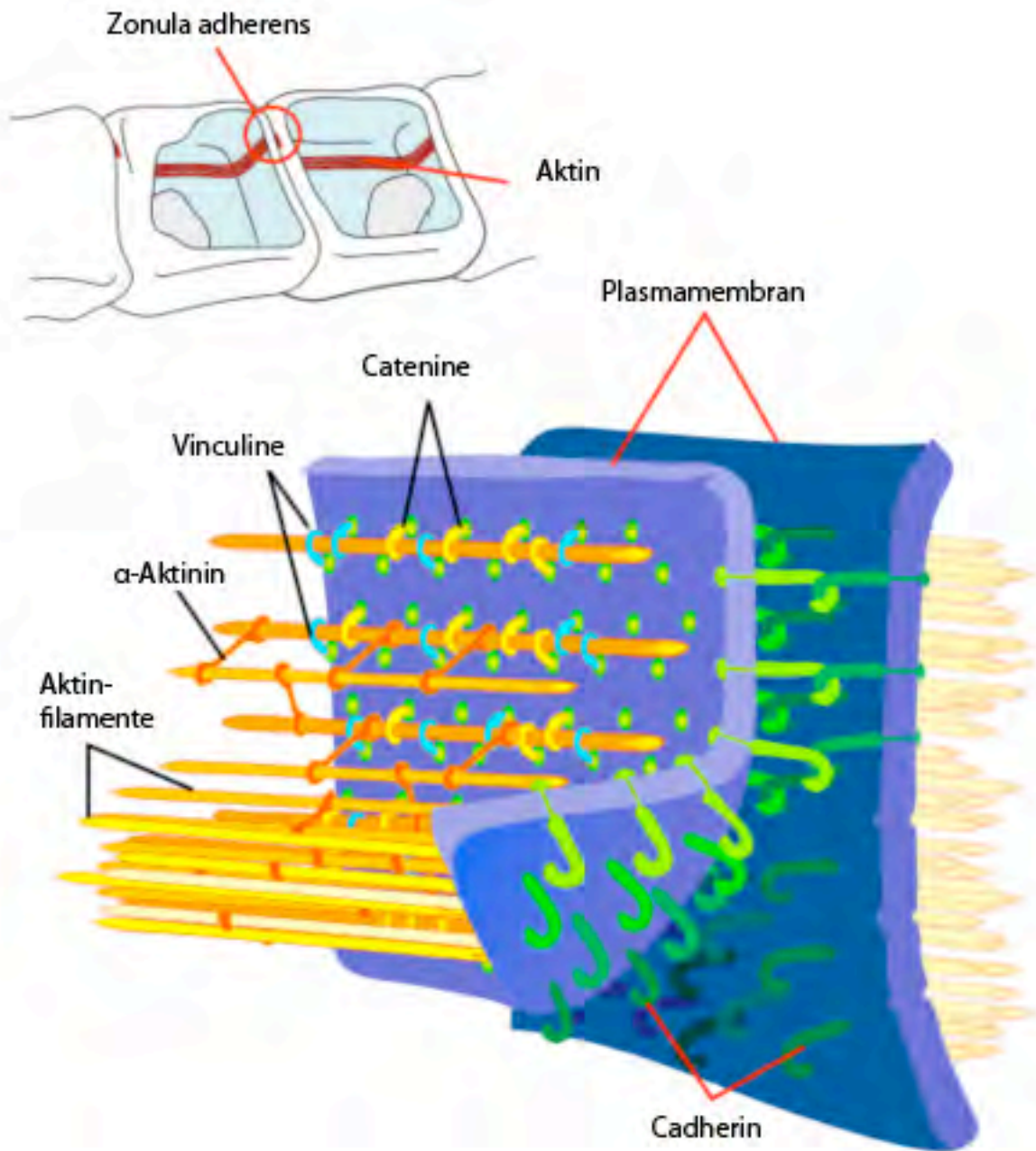


Abbildung 3: Schematische Darstellung der interzellulären Verbindung des E-Cadherin-Catenin-Systems.

Da Metastasierung die Lösung einzelner Zellen oder kleinerer Zellverbände aus dem soliden Primärtumor voraussetzt, ist eine Betrachtung der stabilisierenden Zell-Zell-Interaktionen sinnvoll. In dieser Untersuchung wird gefragt, ob sich durch die drei untersuchten Behandlungsmethoden die Dichte der membranständigen E-Cadherinmoleküle in irgendeiner Weise beeinflussen lässt. Auf der Suche nach einem Erklärungsansatz für die antiadhäsive Wirkung von Taurolidin liegen hier eventuell wertvolle Informationen.

Material und Methoden

Tiere und Tierhaltung

Insgesamt sechzig männliche BD IX-Ratten (Charles River Institute, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 250 bis 300g wurden für dieses Tiermodell geopfert. Die Tiere wurden zwei Wochen vor dem Eingriff im Kleintierlabor der Charité Campus Mitte bei für diese Tiere etablierten, guten Bedingungen zur Gewöhnung aneinander und an das Umfeld zur präoperativen Stressminderung gehalten. Dabei wurde eine Raumtemperatur von 22-24°C und eine Luftfeuchtigkeit von 50-60% konstant bewahrt und ein natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus durch die Beleuchtung gewährleistet. Die Nahrung bestand aus üblichem Standardfutter und Wasser ad libidum. Am Operationstag wurden die zu operierenden Tiere nüchtern gehalten.

Zelllinie und Tumormodell

Die verwendete Zellreihe (DHD/K12/TRb, European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Großbritannien) wurde tiefgefroren geliefert und in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in angewärmtem Dulbeccos MEM (Biochrom, Berlin, Deutschland) und HAMs F10-Medium (Biochrom) in gleichen Anteilen mit zehnprozentigem fetalem Rinderserum (Gibco, Eggenstein, Deutschland), 2mmol/l Glutamin (Biochrom, Deutschland) und Penicillin-Streptomycin 1.000 IE/ml (Gibco, Deutschland) bei einer CO₂-Konzentration von 5%.

Um die erforderliche Tumorzellkonzentration zu standardisieren, wurde eine Passagierung mit Trypsin 0,05% (Biochrom) und EDTA 0,02%

(Biochrom) bei 37°C durchgeführt und drei bis fünf Minuten inkubiert. Das Trypsin konnte durch Zugabe von 5ml Vollmedium neutralisiert werden. Die Suspension wurde für fünf Minuten bei 1.000 Umdrehungen pro Minute (entspricht 200G) zentrifugiert und die Zellpellets in 10ml Vollmedium resuspendiert.

Zur Zellzählung wurde die Suspension mit Trypan-Blau im Verhältnis 1:1 gemischt und unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (0,1µl) unter dem Mikroskop manuell ausgezählt, wobei eine selektive Zählung der vitalen Zellen unter Nichtberücksichtigung avitaler Zellen möglich wurde.

Jetzt wurde die Suspension durch Zugabe einer entsprechenden Menge Fertigmedium in Abhängigkeit von der ausgezählten Zellzahl in der Zählkammer auf die gewünschte Konzentration von 10.000 Zellen/ml verdünnt und jeweils Portionen von 1ml in Eppendorff-Gefäße abgefüllt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. In mehreren Studien hat sich diese Konzentration zur Herbeiführung von intraperitonealen Metastasen und Bauchwandrezidiven bewährt. Kurz vor der Applikation wurden die Suspensionen langsam im Wasserbad aufgetaut und anschließend sorgfältig geschwenkt, damit abgesunkene Zellen wieder aufgewirbelt wurden und eine homogene Suspension vorlag.

Eingriff

Die Allgemeinnarkose wurde durch sterile intraperitoneale Applikation von Pentobarbital 40mg/kgKG im Kleintieroperationssaal unmittelbar vor der Operation eingeleitet. Diese Barbituratdosis führt bei den Tieren in kürzester Zeit zu einer tiefen Analgosedierung unter erhaltener Spontanatmung. Die Tiere atmeten während der gesamten Narkose Raumluft.

Es wurde eine konventionelle Zökumresektion in folgenden Schritten durchgeführt:

Die Bauchwand wurde durch eine mediane Laparotomie von 4cm Länge eröffnet. Es folgte die Exploration des Abdomens, die Lokalisierung von terminalem Ileum und Zökum, welches sich üblicherweise im unteren rechten Quadranten auffinden lässt. Das Zökum erstreckt sich über eine Länge von einem Zentimeter aboral der Valvula ileocaecalis BAUHINII. Die Darstellung und Präparation des Zökums und der versorgenden Gefäße gestaltete sich problemlos; dieser Darmabschnitt ist nicht durch ligamentäre Strukturen befestigt. Eine Arterie und eine Vene laufen longitudinal entlang des Zökums bis zu dessen Ende. Nach Elektrokoagulation der beiden versorgenden Gefäße und Mobilisation des Zökums wurde zur Simulation einer intraoperativen peritonealen Metastasierung eines Kolonkarzinoms durch operationsbedingte Tumorzellverschleppung unmittelbar vor der Resektion des Zökums jeweils 10.000 Zellen der Kolonkarzinom-Zelllinie in 1ml Lösung intraperitoneal appliziert, so dass eine Tumorzellverschleppung zeitgleich zur Resektion nachgeahmt wurde.

Das Zökum wurde resiziert und der Darm in fortlaufender Technik mit PDS 5.0 in zwei Schichten übernäht. Bei jedem Tier wird zusätzlich im linken Oberbauch eine Fläche von 1x1cm vom Peritoneum parietale entfernt.

Randomisierung

Die 60 Tiere wurden randomisiert und wie folgt in vier Gruppen à n=15 eingeteilt:

Kontrollgruppe:

Die Tiere der Gruppe erhielten lediglich eine konventionelle Zökumresektion. Ausserdem wurde ein standardisierter Peritonealdefekt zugeführt. Es erfolgte die intraperitoneale Applikation der Tumorzellsuspension.

Interceed™-Gruppe:

Bei den Tieren dieser Gruppe wurde zusätzlich zur Zökumresektion vor Verschluss der Bauchwand der parietale Peritonealdefekt und die Anastomose mit einer Lage Interceed™ gemäss Anwendungsbestimmungen abgedeckt.

Intergel®-Gruppe:

In dieser Gruppe wurde ebenfalls eine Zökumresektion mit Tumorzellaussaat durchgeführt und zusätzlich 2ml Intergel® im Bereich der Darmanastomose und des Peritonealdefektes appliziert und verteilt.

Taurolin- / Heparin-Gruppe:

In dieser Gruppe wurde den Tieren nach gleichem operativen Vorgehen wie in den anderen Gruppen 2ml Taurolidin 2% mit 10IE Heparin instilliert.

Obduktion

Es wurden 66 Tiere operiert, sechs starben unmittelbar postoperativ. Die mittlere Operationsdauer betrug 21 ± 6 Minuten. Die überlebenden 60 Tiere wurden post operationem für vier Wochen im Kleintierlabor gepflegt und am Tag 28 durch Überdosierung von Phenobarbital unter Ätherarkose getötet und obduziert. Die Obduktion erfolgte unter Verblindung durch drei erfahrene Untersucher. Das Abdomen wurde vom Processus xiphoideus sternii bis zur Symphysis ossium pubis durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Dabei wurden alle peritonealen Metastasen und Bauchwand-/ Narbenmetastasen entnommen und der Bereich der Darmanastomose reseziert. Alle entnommenen Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung so aufbewahrt. Bis zur sachgerechten Entsorgung durch die Tierkörperverwertung wurden die Kadaver bei -21°C aufbewahrt.

Histologie und Immunhistochemie

Unter Gewährleistung kontinuierlicher Kühlung bei -80°C wurden die entnommenen Proben in das immunhistochemische Labor der Pathologie übernommen. Die Proben wurden in zehnpromzentigem Formalin (Herbetha-Arzneimittel, Deutschland) bei Raumtemperatur aufgetaut und für mindestens 24 Stunden in Behältnissen mit einem Mengenverhältnis von zehn Teilen Formalinlösung auf ein Teil Gewebe fixiert und anschließend in einem dunklen, belüfteten Raum aufbewahrt, damit Autolyse und Fäulnis verhindert werden. Die Einbettung in Paraffin wurde mit einem automatischen Einbettkarussell (Shandon Citadel 1000) durchgeführt, welches in einem bereits etablierten Programmablauf die Entwässerung der Proben durch einzelne Bäder mit Aqua destillata, die Alkoholbäder der Konzentrationen 50%, 60%, 80%, 96% und 100% („aufsteigende
22

Alkoholreihe“; Herbetha-Arzneimittel) und Xylol (Baker) die Paraffinierung über Nacht durchführt. Die flüssigparafindurchtränkten Proben wurden an der Einbettstation (Shandon Histocentre 2) in der jeweiligen Probengröße angemessenen Paraffinblöcke gegossen und gehärtet.

Mit einem Mikrotom (Leica RM-2035) wurden unter Verwendung von Feather N35-Klingen 3µm dünne Schnitte angefertigt welche unter Zuhilfenahme eines Warmwasserbades (Leica HI-1210) auf einfache Glasobjektträger (Menzel Superfrost Plus) für histologische Standardfärbungen bzw. auf positiv geladene Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (Menzel Superfrost color) zur Anfertigung von immunhistochemischen Färbungen aufgezogen. Dabei wurden von jedem Präparat eine der Größe des Präparates Rechnung tragende Vielzahl von Schnitten angefertigt, um möglichst repräsentative Stellen bei der mikroskopischen Begutachtung unter anderem zur Auswahl geeigneter Schnitte für die immunhistochemische Untersuchung zur Verfügung zu haben. Das verbleibende Gewebe im Paraffinblock wurde zur eventuellen Nachevaluation aufbewahrt. Zur endgültigen Fixierung des paraffinierten Gewebes auf dem Glas genügte eine Inkubation der Objektträger für zwölf Stunden bei 37°Celsius. Die nativen Präparate konnten jetzt ohne weiteres bis zur Färbung mehrere Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Die Entparaffinierung erfolgte manuell durch drei aufeinander folgende Tauchbäder mit reinem Xylol für jeweils zehn Minuten und anschließender absteigender Alkoholreihe bis in reines Aqua destillata. Von allen Schnitten wurden Hämatoxilin/Eosin-Standardfärbungen, Perjodschiffsäure-Färbungen und Fibrinfärbungen angefertigt.

Hämatoxylin/Eosin-Färbung:

Diese histologische Standardfärbung färbt Zellkerne (und Knorpel) blau und die übrigen Gewebebestandteile rot an durch aufeinander folgende Anwendung von Hämalaun (Hollbora, Deutschland) und Eosin. Hämalaun ist ein dunkelvioletter Farblack zur Zellkernfärbung aus Hämatoxylin und Alaun, der in stark saurer Lösung eine positiv geladene Komplexverbindung mit den Phosphorsäuregruppen der Nukleinsäuren des Kernchromatins eingeht und nach Erhöhung des pH durch Spülen unter Leitungswasser ausbläut und stabilisiert wird.

Eosin ist ein vom Fluoreszein abgeleiteter, saurer, roter Xanthenfarbstoff, mit welchem azidophile Zell- und Gewebebestandteile angefärbt werden. (Reallexikon der Medizin, Urban & Schwarzenberg)

PAS-Reaktions-Färbung:

Die PAS-Reaktion (periodic acid schiff reaction) nach Hotchkiss und McManus ist ein histochemischer Nachweis von Poly- und Mucopolysacchariden, Glycoproteinen und Phospholipiden in Gewebeschnitten, indem nicht substituierte Glykolgruppen mit wässriger Perjodsäurelösung zu Aldehyden aufgespalten und oxidiert werden, die sich dann mit fuchsinschweflicher Säure (Schiff-Reagenz) durch Bildung eines roten, basischen Farbstoffes nachweisen lassen.

Immunhistochemie:

Die Immunhistochemie dient der exakten lichtmikroskopischen Lokalisation eines Antigens in einem Gewebe bei hoher Sensitivität¹⁰⁴. Dabei reagieren enzymgebundene Antikörper entweder direkt oder indirekt, d.h. über einen Brücken-/Sekundärantikörper mit dem gesuchten Antigen im Gewebe. Bei der indirekten Methode wird eine Verstärkung des Nachweissignals erzielt, weil mehrere Sekundärantikörper an den konstanten Teil des Primärantikörpers binden können. Der hieraus folgenden höheren Sensitivität wegen wurden indirekte Nachweismethoden bevorzugt. Für den Nachweis von CD44 und β_1 -Integrin kam Meerrettich-Peroxidase als Markerenzym zum Einsatz. Hierbei wird ein Enzym-Anti-Enzym-Komplex zugegeben und durch einen Brückenantikörper an den primären Antikörper fixiert. Der Antikörper gegen das Enzym und der primäre Antikörper stammen von derselben Spezies - in diesem Falle von der Maus - während der Brückenantikörper gegen Immunglobuline dieser Spezies gerichtet ist (siehe Abbildung 4).

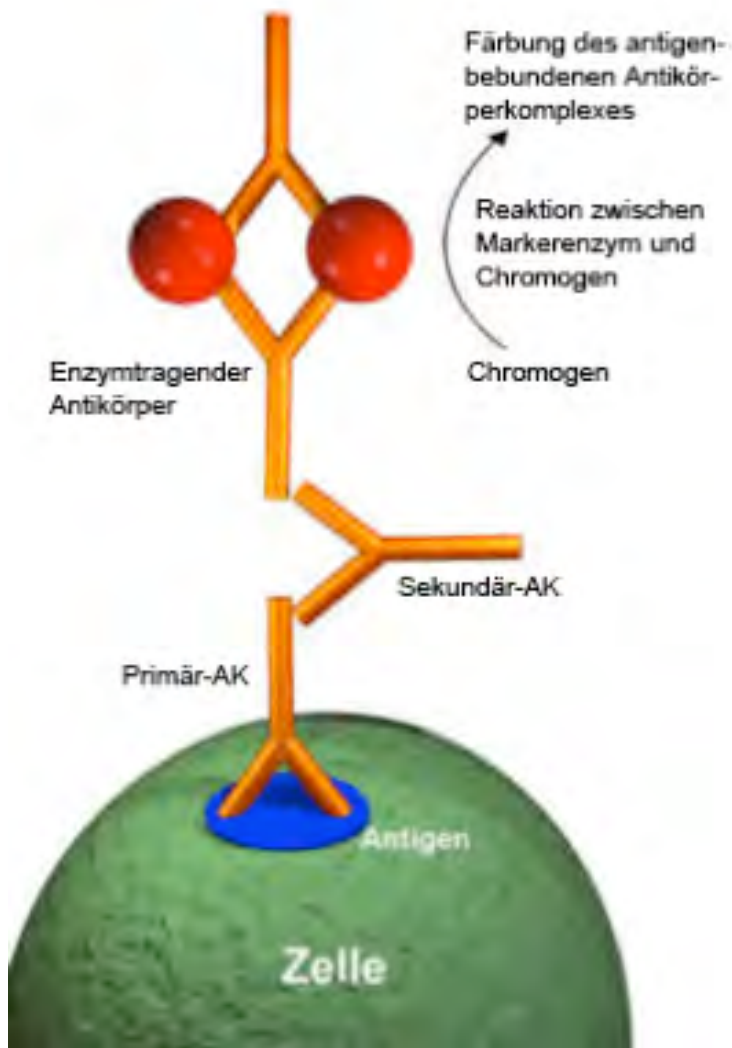


Abbildung 4: Prinzip der Immunhistochemie

Um Antigene mit immunhistochemischer Technik nachweisen zu können, muss das gesuchte Antigen zunächst demaskiert werden, um die durch die Formalinfixierung und Paraffineinbettung verloren gegangene Immunreaktivität wiederherzustellen¹⁰⁵. Hierzu wurden die Objektträger für fünf Minuten in Citratpufferlösung bei einem pH von 6,0 gekocht. Zur Herstellung des Citratpuffers wurden 37,82g Zitronensäure (Merck) und 241,1g Natriumcitrat (Merck) in 10l Aqua destillata gelöst (Stammlösung) und anschließend 1:10 verdünnt.

Der Nachweis von CD44 erfolgte mit Histofine[®] Simple Stain Rat MAX PO(R), einem kurzen Aminosäurepolymer, an welches eine Vielzahl von Peroxidase tragenden Ziege-Anti-Ratte-IgG-Antikörper-F_{ab}-Fragmente konjugiert sind (Universal Immuno-Peroxidase Polymer).

Der Nachweis von β 1-Integrin ließ sich durch Verwendung von PicTure-Kit (Zymed), einem Meerrettichperoxidase tragenden Polymer etablieren.

Um die gewebeeigene Peroxidase zu blockieren wurden die Objektträger nach der Antigendemaskierung und Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe für dreißig Minuten in 10%ige H₂O₂-Methanol-Lösung getaucht und anschließend dreimal für fünf Minuten in Aqua destillata gespült. Die Objektträger wurden nun ausführlich mit frischem Tris-Puffer (TBS) gespült. TBS wurde wie folgt hergestellt: 9,0g Tris-Base (Aminomethan Merck 8382), 68,5g Tris-HCl (Merck 1.08219) und 87,8g NaCl (Merck 6404) in 1l Aqua destillata lösen und anschließend auf 10l mit Aqua destillata bis zum Erreichen eines Puffer-pH zwischen 7,4 und 7,6 auffüllen.

Um möglichst wenig Verlust von Antikörperlösung und Detektionsreagens durch breitflächiges Verlaufen auf den Objektträgern während der Inkubationszeiten in Kauf nehmen zu müssen, wurden alle Präparate auf den Objektträgern mit einem PAP-Pen (Zymed) umrandet, so dass eine tropfenförmige Konzentration der Reagenzien selektiv über dem Präparat gewährleistet war und ein Reagenzieneinsatz von 100 μ l ausreichte, um die Proben vollständig zu benetzen. Für die Durchführung der folgenden Schritte wurden die Objektträger in einer eigens für die Immunhistochemie entworfenen feuchten Kammer gehalten, um Austrocknung durch

Verdunstung während der Inkubation mit den verschiedenen Nachweisreagenzien zu verhindern.

Nichtspezifische Bindungsstellen für den sekundären Antikörper wurden durch Inkubation für zehn Minuten mit Background Eraser (Biocarta Europe GmbH, Hamburg, Deutschland) blockiert. Background Eraser ist eine pH-optimierte Lösung aus zehnpotentem Ziegen Serum in PBS mit Surfactant und Konservierungsstoffen. Ohne darauf folgende Spülung wurden die Objektträger mit Antigenlösungen, deren Konzentrationsoptima in vorangegangenen Versuchsreihen etabliert wurden, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Optimale Ergebnisse ergaben sich für den Nachweis von β_1 -Integrin bei einer Antikörperverdünnung von 1:500, CD44 von 1:10.000 und E-Cadherin von 1:200. Als Verdünnungsmittel eignete sich Antigen-Diluent (Dako).

Folgende Antikörper fanden Anwendung:

Muriner, monoklonaler Antikörper gegen β_1 -Integrin, Klon 18 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland),

muriner, monoklonaler Antikörper gegen CD44, Klon OX49 (BD Biosciences) und

muriner, monoklonaler Antikörper gegen E-Cadherin, Klon 4A2C7 (Zymed GmbH, Berlin, Deutschland).

Es wurden bei jedem Durchgang neunzehn Präparate und eine Negativkontrolle in der feuchten Kammer behandelt. Die Behandlung der Negativkontrolle unterschied sich lediglich in der Inkubation des Objektträgers mit reinem Diluent anstelle von Primärantikörperlösung. Alle anderen Schritte wurden gleich durchgeführt, so dass anhand der Negativkontrolle bei jedem Färbezyklus nachgewiesen werden konnte, dass nur Stellen gefärbt wurden, an denen eine Bindung des Primärantikörpers an das entsprechende Epitop im Gewebe stattgefunden hat. Ließ sich nach Abschluss der folgenden Färbeschritte auf der Negativkontrolle an irgendeiner Stelle eine Färbung nachweisen, musste von einer Verunreinigung oder einem anderen Fehler in dem Färbevorgang ausgegangen und alle neunzehn Präparate des jeweiligen Zyklus verworfen werden.

Nach einer Stunde wurde die Primärantikörperlösung kurz mit Leitungswasser und TBS-Tween abgespült und anschließend gründlich mit TBS nachgespült. TBS-Tween ist eine Lösung hergestellt aus 993ml Tris-Puffer, 1ml Tween (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate $C_{58}H_{111}O_{26}$) und 6g NaCl.

Nachweis von β_1 -Integrin

Die mit dem β_1 -Integrin-Antikörper getesteten Objektträger wurden nun für dreißig Minuten mit dem Detektionskit PicTure-Plus Kit (Zymed Laboratories Inc., Carlton Court, USA) wieder in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei handelt es sich um ein Aminosäurepolymer, an welches multiple Meerrettichperoxidase-Moleküle und Fab-Fragmente konjugiert sind und so Sekundärantikörper und Markerenzym in einem Schritt an das Antigen im Gewebe bindet. Die F_{ab} -Fragmente des Polymerkomplexes sind gegen den nichtvariablen F_c -Teil des Primärantikörpers gerichtet und dienen als Brücke zwischen dem ersten Antikörper und dem das Markerenzym tragenden Polymer. Die Verwendung einer solchen Polymertechnik erzeugt grundsätzlich weniger Hintergrundfärbung als die getrennte Anwendung von Sekundärantikörper und enzymgebundenen Antikörper, da nur einmal ein auf Protein basierendes Reagenz zum Einsatz kommt. Nach Immunkomplexbildung zwischen Primärantikörper und Epitop befindet sich die Meerrettich-Peroxidase nun selektiv über den entsprechenden Antigenlokalisationen im Gewebe und kann jetzt hochspezifisch angefärbt und lichtmikroskopisch nachgewiesen werden.

Nachweis von CD44

Zum Nachweis von CD44 hat das Detektionssystem HistoFine (Nichirei, Tokyo, Japan vertrieben durch Medac GmbH, Wedel, Deutschland) nach Austestung mehrerer erhältlicher Detektionskits in vorangegangenen Versuchsreihen die besten Ergebnisse geliefert. Hierbei handelt es sich um ein kurzes Aminosäurepolymer, an welches multiple Meerrettichperoxidase-Moleküle und Anti-Ratte-IgG-Antikörper-F_{ab}-Fragmente konjugiert sind (Universal Immuno-peroxidase Polymer, UIP) und so Sekundärantikörper und Markerenzym in einem Schritt an das Antigen im Gewebe binden. HistoFine wird genauso angewendet, wie PicTure-Kit und führt zu guten Färbungen.

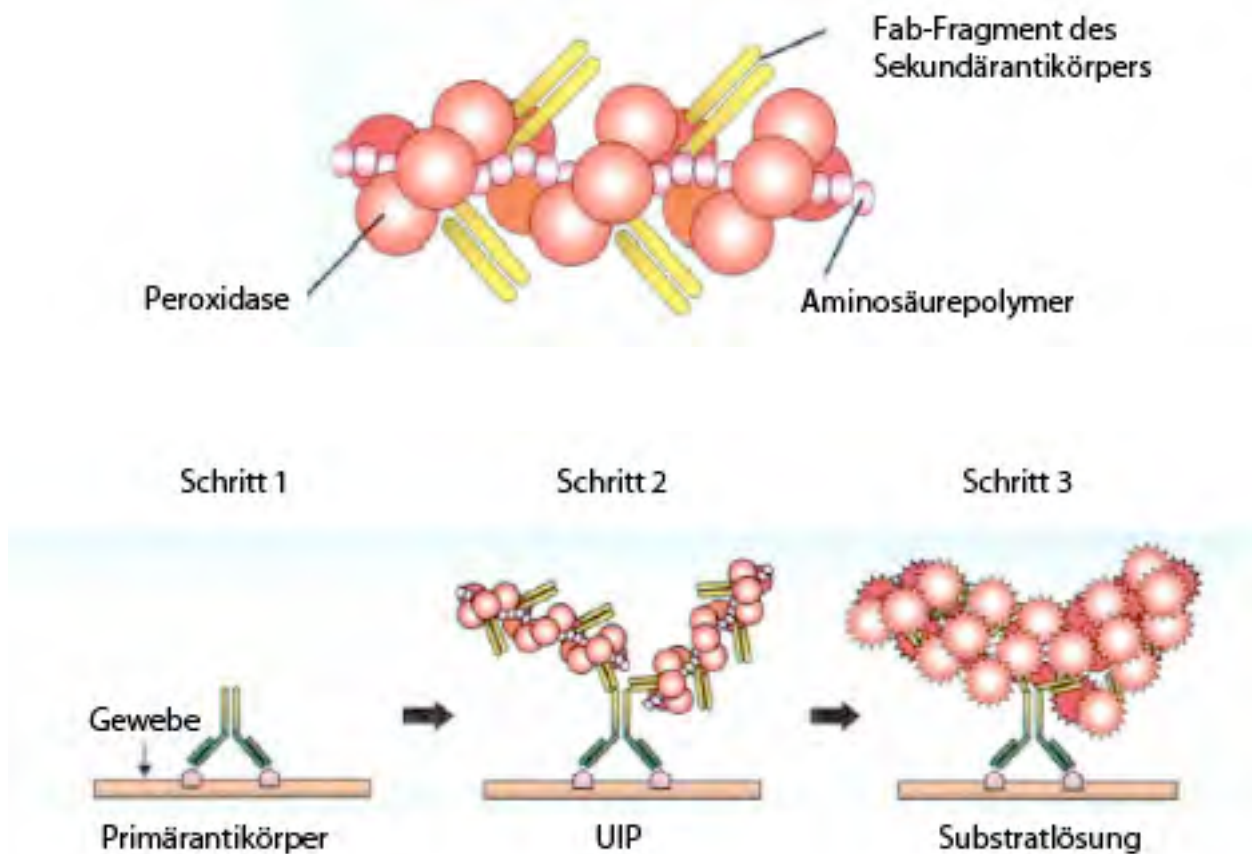


Abbildung 5: Funktionsschema des Detektionssystems HistoFine® Simple Stain Rat MAX PO(R) (Nichirei, Tokyo, Japan). Quelle: Produktbeschreibung des Herstellers

Chromogenreaktion

Als chromogenes Substrat für die Meerrettichperoxidase eignet sich 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in H_2O_2 . Es kommt zu einer gegenüber organischen Lösungsmitteln stabilen braunen Farbreaktion. Cardassian DAB (Biocarta) wird in den Einzelkomponenten Substratpuffer, Chromogen und Enhancer in Tropffläschchen geliefert, welche entsprechend der Gebrauchsvorschrift des Herstellers unmittelbar vor der Anwendung vermischt werden. Die fertige Chromogenlösung muss nun auf jeden Objektträger aufgetragen werden und nach jeweils exakt zwei Minuten mit Leitungswasser abgespült werden, um die Färbereaktion zu stoppen. Diese Reaktionszeit wurde in vorbereitenden Versuchsreihen ermittelt.

Nachweis von E-Cadherin

In umfangreichen Vorversuchsreihen zum Nachweis von E-Cadherin zeigte das *4plus*TMALP500 Detektionskit (Biocarta) die besten Ergebnisse. Dieses System funktioniert nach der (Strept-)Avidin-Biotin-Alkalische Phosphatase-Komplex-Methode, womit es sich prinzipiell etwas von den vorbeschriebenen Detektionssystemen unterscheidet.

Bei dieser Methode macht man sich zu Nutzen, dass das in großer Menge in Hühnereiweiß vorkommende Glykoprotein Avidin mit einem Molekulargewicht von 68 kDa und das ähnlich strukturierte Streptavidin aus *Streptomyces Avidinii* eine extrem hohe Bindungsaffinität ($K_d=10^{-15}$) für das wasserlösliche Vitamin Biotin haben, wobei jeweils vier Bindungsstellen die Komplexbildung von vier Biotinmolekülen mit einem Streptavidinmolekül vermitteln. Der Vorteil bei der Verwendung von Streptavidin gegenüber Avidin liegt in dem Fehlen von Kohlenhydratseitenketten, was zum einen

über die weitestgehende Elektroneutralität bei neutralem pH (6,5 im Gegensatz zu 10) zu einer verminderten unspezifischen Hintergrundfärbung führt und zum zweiten aufgrund der sterisch günstigeren Reaktionseigenschaften zu einer erhöhten Sensitivität führt.

Über einen biotinylierten Brückenantikörper (Ziege-anti-Maus-IgG) wird ein vorgefertigtes Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat an das gewebeeigene Antigen fixiert. Der Brückenantikörper (Universal Link) wird nach der Inkubation mit dem Primärantikörper und gründlicher Spülung mit Leitungswasser, TBS-Tween und TBS-Puffer wie oben beschrieben in der feuchten Kammer auf die Objektträger getropft und für zwanzig Minuten inkubiert. Anschließend werden die Objektträger erneut gründlich mit TBS-Puffer gespült und für weitere zwanzig Minuten mit dem Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat inkubiert und wiederum gründlich mit TBS-Puffer gespült. Alkalische Phosphatase dient dabei als Markerenzym und wird mittels Naphthol-AS-MX-Phosphat mit Fast Red, welches eine rote Farbreaktion hervorruft, nachgewiesen.

Da bei dieser Technik nicht Meerrettichperoxidase sondern alkalische Phosphatase als Markerenzym dient, wurden die Präparate während der Entparaffinierung und Hydrierung auch nicht der Blockierung endogener Peroxidase durch H_2O_2 unterzogen. Statt dessen kann endogene alkalische Phosphatase bei dieser Technik durch die Zugabe von Levamisol zur Chromogenlösung blockiert werden, was jedoch in der Regel nur bei Präparaten alkalische-Phosphatase-reicher Organe wie Niere, Leber und Plazenta notwendig ist. In Vorexperimenten erwies sich Vulcan Fast Red (Biocarta) als das Chromogenprodukt mit den besten Eigenschaften. Es wird in den Einzelkomponenten Substrat, Chromogen,

Levamisol und Puffer in Tropffläschchen geliefert, welche gemäss Herstellervorschrift zum fertigen Chromogenreagenz unmittelbar vor der Anwendung vermischt werden müssen. Die Blockierung endogener alkalischer Phosphatase durch Beimengung von Levamisol führte nach vorexperimenteller Evaluierung zu keiner Verbesserung der Signale, so dass auf die Anwendung verzichtet wurde.

Eine Reaktionszeit von exakt sechs Minuten führte zu einem optimalen Nachweis. Vulcan Fast Red reagiert mit alkalischer Phosphatase im Gegensatz zu den meisten anderen erhältlichen Fast-Red-Lösungen zu einer organischen Lösungsmitteln standhaltenden Färbung, so dass die gefärbten Präparate durch die aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und nach Xylolbad auf herkömmliche Weise mit VitroClud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eingedeckt werden konnten.

Zusätzlich zur immunhistochemischen Färbung wurden alle Präparate vor der Eindeckung einer Kerngegenfärbung unterzogen, um eine bessere Orientierung bei der lichtmikroskopischen Untersuchung des Gewebes zu ermöglichen. Die bereits antigenmarkierten Präparate wurden nach kurzer Spülung in Aqua destillata für neunzig Sekunden in Hämalun getaucht und anschließend für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Alle drei nachzuweisenden Antigene (CD44, β_1 -Integrin und E-Cadherin) sind an der Zellmembran von Epithelien lokalisierte Oberflächenantigene, so dass eine Kernfärbung keinen störenden Einfluss auf die Beurteilbarkeit hat.

Die gefärbten Präparate wurden durch die aufsteigende Alkoholreihe wieder entwässert und in Xylol getaucht, um die Deckgläschen (Menzel)

mit dem hydrophoben Kleber VitroClud permanent über die Präparate zu kleben.

Mikroskopische Untersuchung

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurde ein professionelles Forschungsmikroskop der Firma Leica verwendet. Alle Präparate wurden vor der Untersuchung randomisiert gekennzeichnet, so dass aus der Beschriftung während der Untersuchung kein Rückschluss auf die jeweilige Behandlungsgruppe gezogen werden konnte. Zur Anwendung kam dabei ein kodierte Kennzeichnungssystem, welches später anhand eines vorher angefertigten tabellarischen Schlüssels die Wiederzuordnung der einzelnen Präparate zu den Behandlungsgruppen ermöglichte.

Anhand der Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Schnitte wurden zunächst aus allen angefertigten Schnitten jeweils die günstigsten aussortiert. Es wurde dabei auf Qualität bei der Vorbereitung der Präparate wie z.B. Freiheit von Artefakten, Repräsentativität des angeschnittenen Präparatbereichs, gleichmäßige Schnittfläche geachtet und bei jedem Präparat eine eindeutige histologische Organdiagnose vorgenommen, um Fehler bei der Probenentnahme während der Obduktion aufzudecken. Ebenso wurden Präparate, bei denen trotz der so kurz wie technisch möglich gehaltenen Zeit zwischen Eintritt des Todes und Eintauchen der Probengefäße mit dem entnommenen Gewebematerial in flüssigem Stickstoff sowie zwischen Entnahme aus dem Probengefäß zur Umlagerung in die Fixationslösung zu ausgeprägteren autolytischen Veränderungen gekommen war, aussortiert. Besondere Auffälligkeiten zu einzelnen Präparaten wie z.B. granulozytäre oder lymphozytäre Infiltrationen, Besonderheiten an

Strukturen des mukosaassoziierten lymphatischen Gewebes wurden zur eventuellen nachfolgenden Auswertung schriftlich festgehalten.

Untersuchung der PAS-gefärbten Präparate

Die Untersuchung erfolgte durch zwei erfahrene Untersucher. Besonderes Augenmerk wurde auf den Nachweis von pathologischen mukoiden Strukturen gelegt.

Untersuchung der „Fibrinfärbungen“

Die Untersuchung erfolgte durch zwei erfahrene Untersucher. Besonderes Augenmerk wurde auf den Nachweis von pathologischen fibrinösen Strukturen gelegt.

Die Untersuchung der immunhistochemisch gefärbten Präparate wurde semiquantitativ in fünf unsortierten Durchgängen vorgenommen so dass jedes Präparat insgesamt fünfmal begutachtet wurde, um einen systematischen Störeinfluss durch die natürliche Subjektivität des Untersuchers zu minimieren. Die Präparate wurden gemäß dem in vorangegangenen Untersuchungen mit Bobrich gemeinsam etablierten Bewertungsscore durchgeführt. Dabei wird der prozentuale Anteil positiv gefärbter Zellen geschätzt und in einer Vier-Punkte-Skala wie folgt bewertet: 0%="negative" (keine Expression), 0-25%="weak" (schwaches Expressionsmuster), 25-75%="moderate" (mässiges Expressionsmuster) und 75-100% „strong“ (starkes Expressionsmuster). Hierbei gilt es zu bedenken, dass z.B. das Vorliegen des Expressionsmusters „negative“ nicht bedeutet, dass die Zellen überhaupt kein entsprechendes Antigen exprimieren. Vielmehr wurden die Nachweismethoden durch die Wahl geeigneter Reagenzien, Konzentrationen, Reaktionszeiten und -

temperaturen in umfangreichen Vorexperimenten so sensitiv eingerichtet, dass ein maximaler Unterschied in den Signalstärken deutlich wurde. Dieses Verfahren lässt lediglich einen semiquantitativen Vergleich der einzelnen Behandlungsgruppen und keine quantitative Bestimmung des Behandlungseffektes zu.

Begutachtet wurden peritoneale Metastasen, Metastasen im Bereich der Laparotomienarbe sowie Kolonepithel im unmittelbaren Umfeld der Anastomose und an entfernteren Stellen. Für die statistische Auswertung mittels χ^2 -Test wurden die Bewertungen numerisch umskaliert, so dass „negative“=0, „weak“=1, „moderate“=2 und „strong“=3 entspricht. Die erhobenen Rohdaten wurden mithilfe des Statistikprogrammes SPSS 11 für MacOS X (englische Version) ausgewertet. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert kleiner 0.05 angesehen.

Ergebnisbeschreibung

Allgemeines

Alle Tiere, welche die perioperative Phase überlebten, zeigten während der postoperativen Zeit bis zur Tötung klinisch keine Komplikationen oder Auffälligkeiten. Zu jedem Präparat fand sich eine hinreichende Anzahl für die immunhistochemische Untersuchung geeigneter Schnitte mit guter Repräsentativität der darzustellenden Strukturen.

Makroskopische Auswertung

Lokalrezidive

Therapiegruppe Intergel®

Lokalrezidive an der Darmanastomose traten in dieser Therapiegruppe bei zwölf von fünfzehn Tieren auf. Das entspricht einer Häufigkeit von 80%.

Therapiegruppe Interceed™

Lokalrezidive traten bei zwölf von fünfzehn (80%) Tieren auf.

Therapiegruppe Taurolidin / Heparin

Die Häufigkeit von Lokalrezidiven ist mit neun von fünfzehn (60%) in dieser Gruppe gleich der in der Kontrollgruppe nachgewiesenen.

Kontrollgruppe

Neun von fünfzehn (60%) Tieren wiesen Lokalrezidive auf.

Hinsichtlich des Auftretens von Lokalrezidiven kann in dieser Untersuchung kein signifikanter Therapieeffekt dargestellt werden.

Intraperitoneale Metastasen

Therapiegruppe Intergel

In dieser Therapiegruppe konnten bei allen fünfzehn Tieren insgesamt 123 intraperitoneale Metastasen nachgewiesen werden. Der Mittelwert liegt bei 8.2, die Standardabweichung beträgt 3.82.

Therapiegruppe Interceed

Es wurden insgesamt 114 Metastasen nachgewiesen. Der Mittelwert beträgt 7.6, die Standardabweichung 5.04.

Therapiegruppe Taurolidin / Heparin

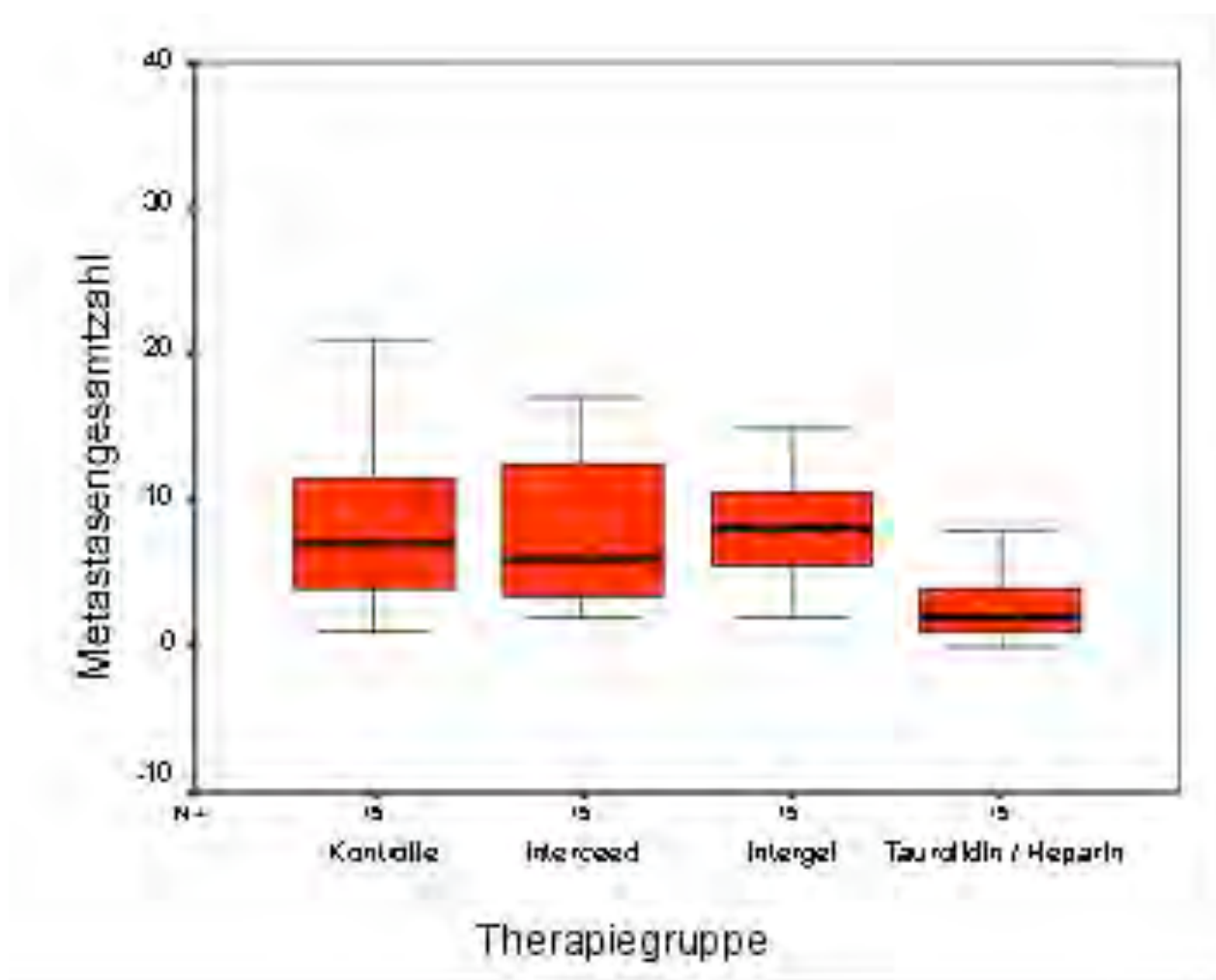
In dieser Gruppe liessen sich insgesamt 48 Metastasen nachweisen. Der Mittelwert beträgt 3.2 bei einer Standardabweichung von 2.96.

Kontrollgruppe

Ohne Therapie betrug die Gesamtmetastasenanzahl 165. Der Mittelwert liegt bei 11.0, die Standardabweichung beträgt 11.14.

	Metastasengesamtzahl
Kontrolle (n=15)	11.0 [11.14]
Interceed (n=15)	7.6 [5.04]
Intergel (n=15)	8.2 [3.82]
Taurolidin / Heparin (n=15)	3.2 [2.96]*

Mittelwert und [Standardabweichung] Kruskal-Wallis-test: * = $p < 0.003$



	Metastasengesamtgewicht (mg)
Kontrolle (n=15)	330.1 [269.6]
Interceed (n=15)	222.3 [215.4]
Intergel (n=15)	205.7 [204.3]
Taurolidin / Heparin (n=15)	65.0 [75.6]*

Mittelwert und [Standardabweichung] Kruskal-Wallis-test: * = $p < 0.008$

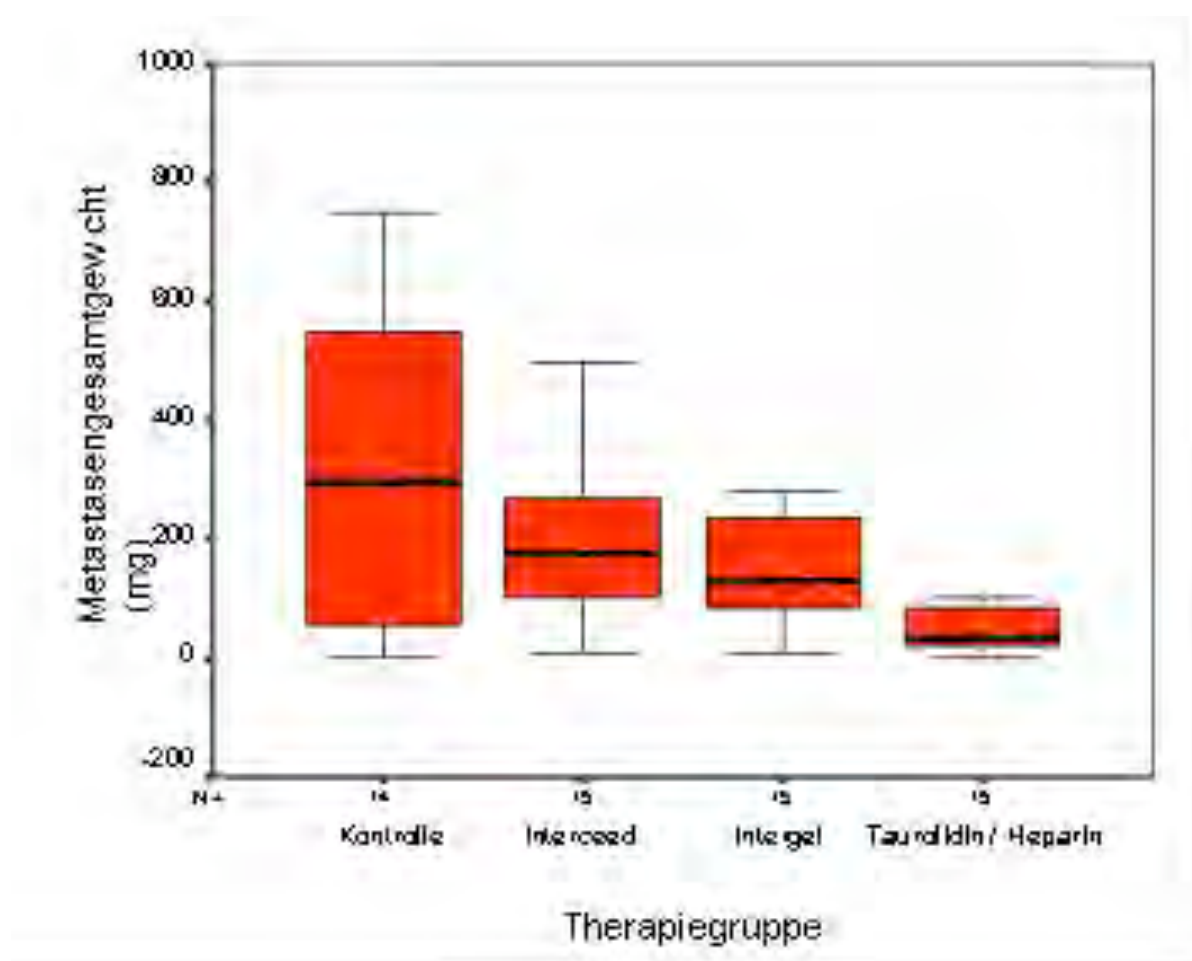


Abbildung 6: Gesamtgewicht der intraperitonealen Metastasen (Median und 95%-Konfidenzintervall). ANOVA-Analyse, post-hoc Test mit Bonferroni-Korrektur: $p = 0.01$.¹⁰⁶

Lokalisation	Anzahl der Metastasen			
	Kontrolle n=15	Interceed n=15	Intergel n=15	Taurolidin / Heparin n=15
Peritonealnarbe	1.07 [1.39]	0.80 [1.37]	0.53 [1.30]	0.13 [0.35]
Laparotomienarbe	1.60 [1.72]	1.07 [0.88]	0.73 [0.80]	0.47 [0.64]*
Lokalrezidiv	3.20 [4.09]	2.13 [1.92]	2.27 [2.05]	1.73 [1.94]

Mittelwert und [Standardabweichung] Kruskal-Wallis-Test: * = $p < 0.045$

Abbildung 7: Lokalisation der Metastasen: Mittlere Anzahl pro jeweiliger Lokalisation. „Omentum und Mesenterium“ = Omentum majus und minus ($p=0.02$); „Bauchwand“ = Peritonealdefekt und Laparotomienarbe ($p=0.001$); „Intraperitoneal“ = kleines Becken, Dünndarm, Zwerchfell, paraaortale Lymphknoten, Pankreas, Leber und Nieren ($p=0.02$).

Die intraperitoneale Metastasenanzahl wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe durch die Applikation von Taurolidin / Heparin signifikant verringert ($p=0.003$). Die Metastasenzahlen in den anderen beiden Therapiegruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Histochemische Untersuchungen

Untersuchung der HE-gefärbten Schnitte

Die HE-Färbung wurde bei allen Proben zur Verifizierung von zur immunhistochemischen Untersuchung geeigneten, repräsentativen Schnitten durchgeführt. Bei der mikroskopischen Untersuchung der HE-gefärbten Präparate ergaben sich keine Besonderheiten. Die Färbung ergab Bilder wie in der folgenden Abbildung:

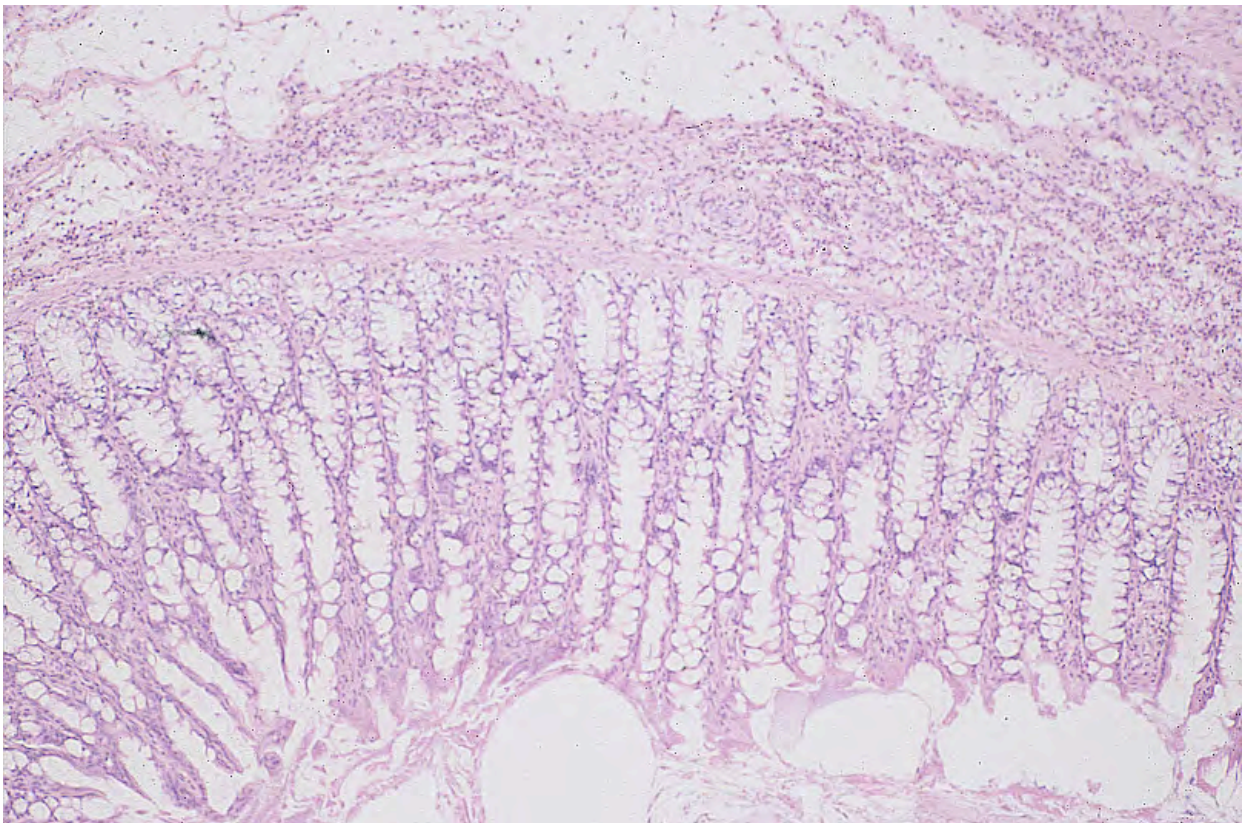


Abbildung 8: Hämatoxylin-Eosin-Standardfärbung eines Darmabschnittes in hundertfacher Vergrößerung

Untersuchung der PAS-gefärbten Schnitte

Anhand der PAS-Färbungen ließ sich weder an den Kolonanastomosen noch an den Metastasen ein pathologisches Vorkommen muzinöser Anteile oder anderer Mukopolysaccharide nachweisen. Die Anfärbung ergab beispielsweise folgendes normales histologisches Bild:

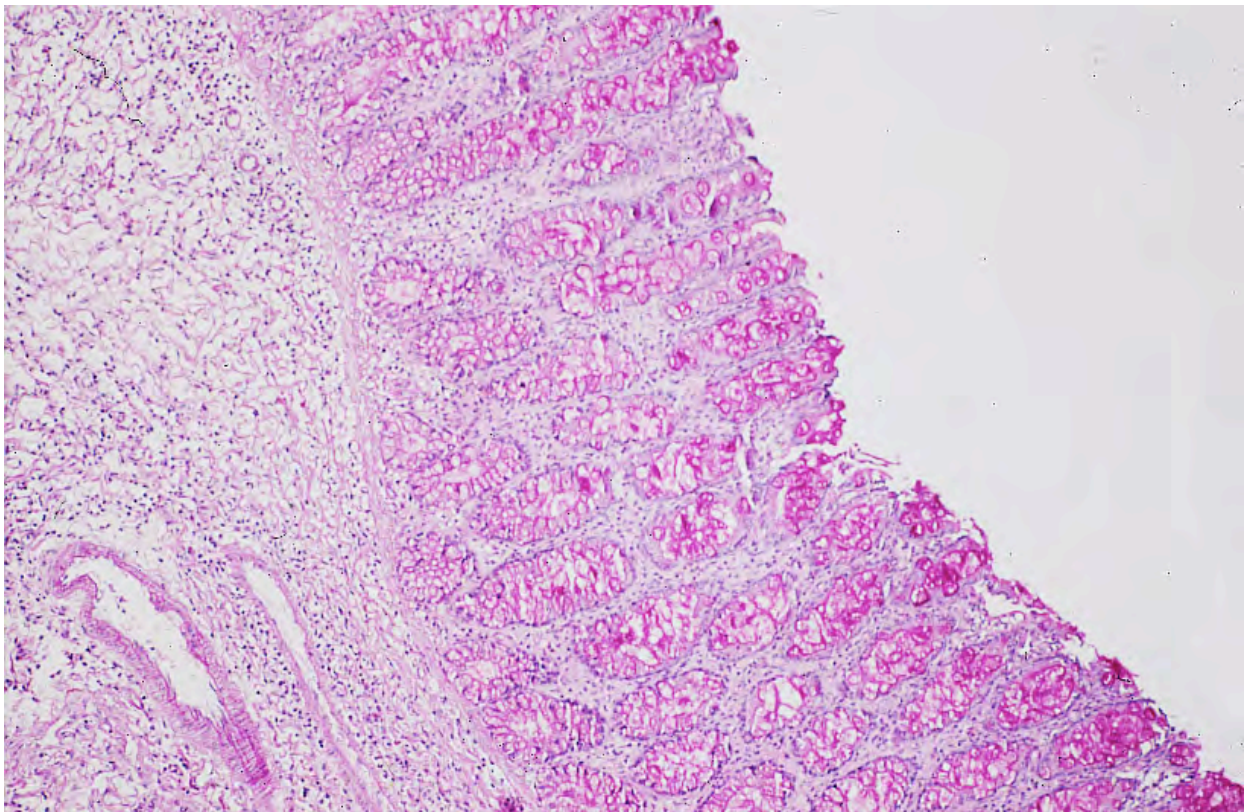


Abbildung 9: Darmabschnitt in PAS-Färbung. Hundertfache Vergrößerung.

Untersuchung der Fibrin-Nachweise

Bei der Untersuchung der Fibrin-Nachweise ergab sich kein pathologisches Vorkommen von fibrinösen Strukturen weder im Bereich der Kolonanastomosen noch an den Metastasen.

Bei der Obduktion der Tiere fanden sich makroskopisch fibrinöse Adhäsionen, diese wurden in dieser jedoch Studie nicht histologisch untersucht. Die makroskopische Auswertung wurde in früheren Studien beschrieben.

Folgendes beispielhaft ausgewählte Bild ergab sich bei der Fibrinfärbung:

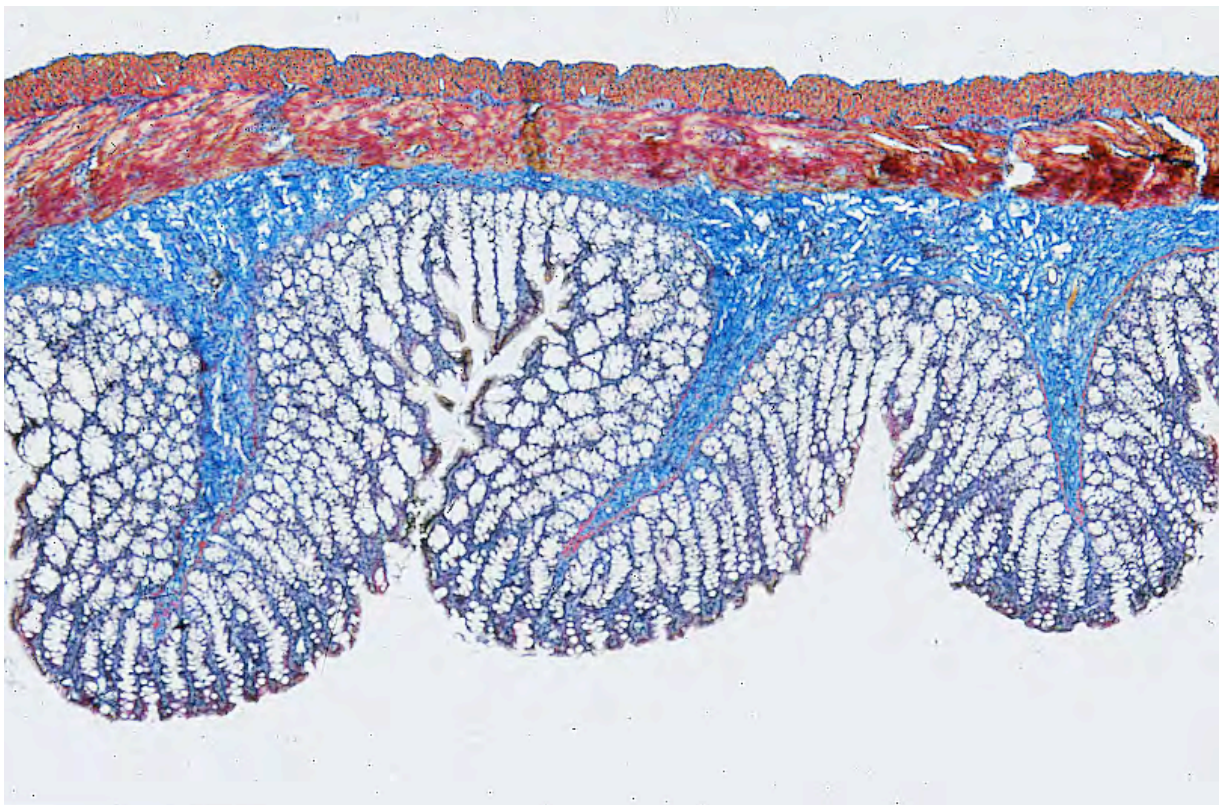


Abbildung 10: Darmepithel nach Anwendung der „Fibrinfärbung“ (Vergrößerung hundertfach)

Eine intraperitoneale Metastase zeigt sich in der Fibrinfärbung wie folgt:

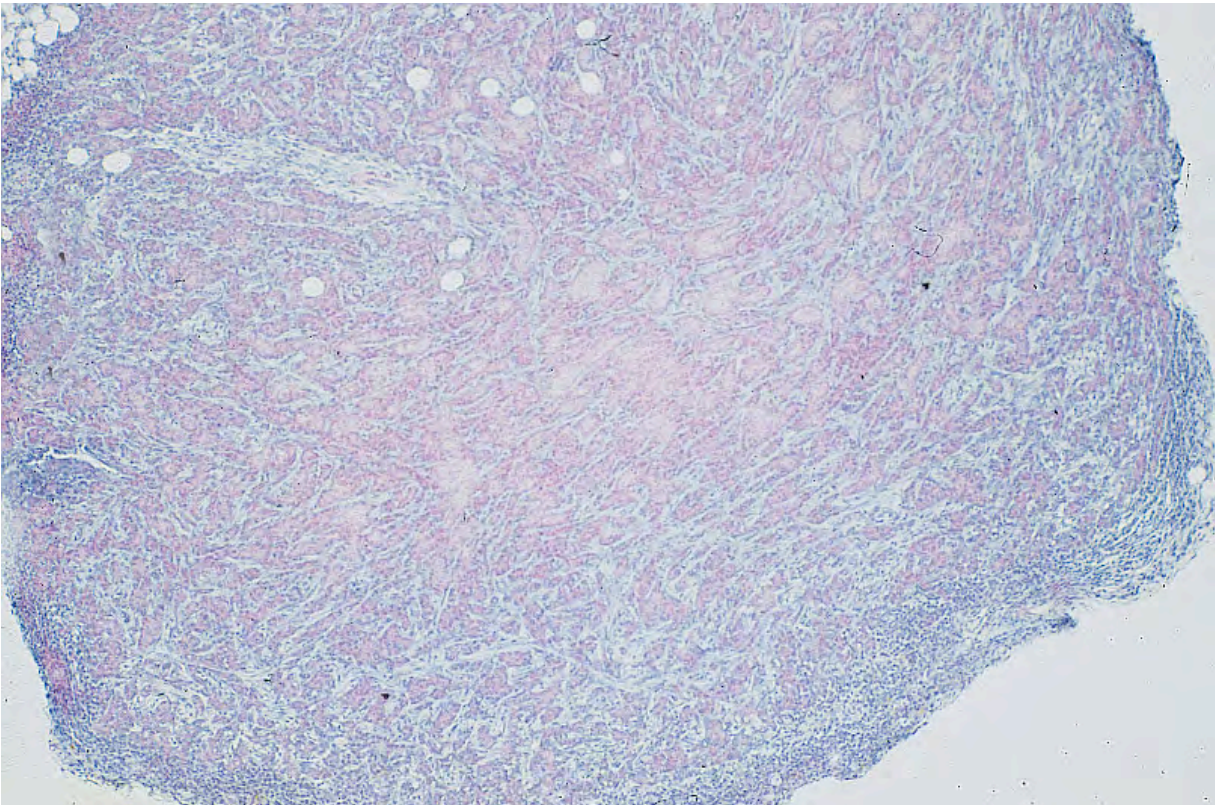


Abbildung 11: Übersicht einer Metastase in der Fibrinfärbung (Vergrößerung 40-fach)

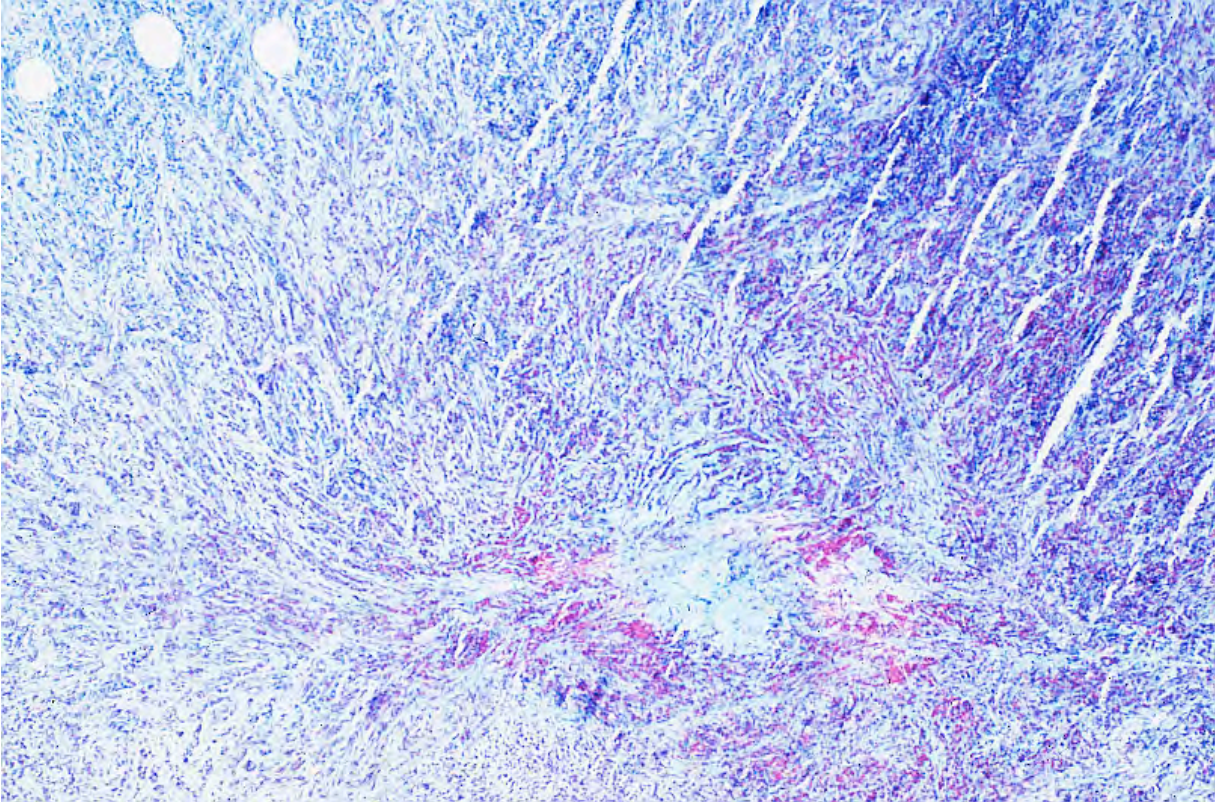


Abbildung 12: Ausschnitt einer Metastase nach Fibrinfärbung in hundertfacher Vergrößerung

Immunhistochemische Untersuchungen

Messung von CD44 auf dem Epithel der Kolonanastomosen

Beispielhafte Darstellung eines Nachweises von CD44 am Darmepithel:

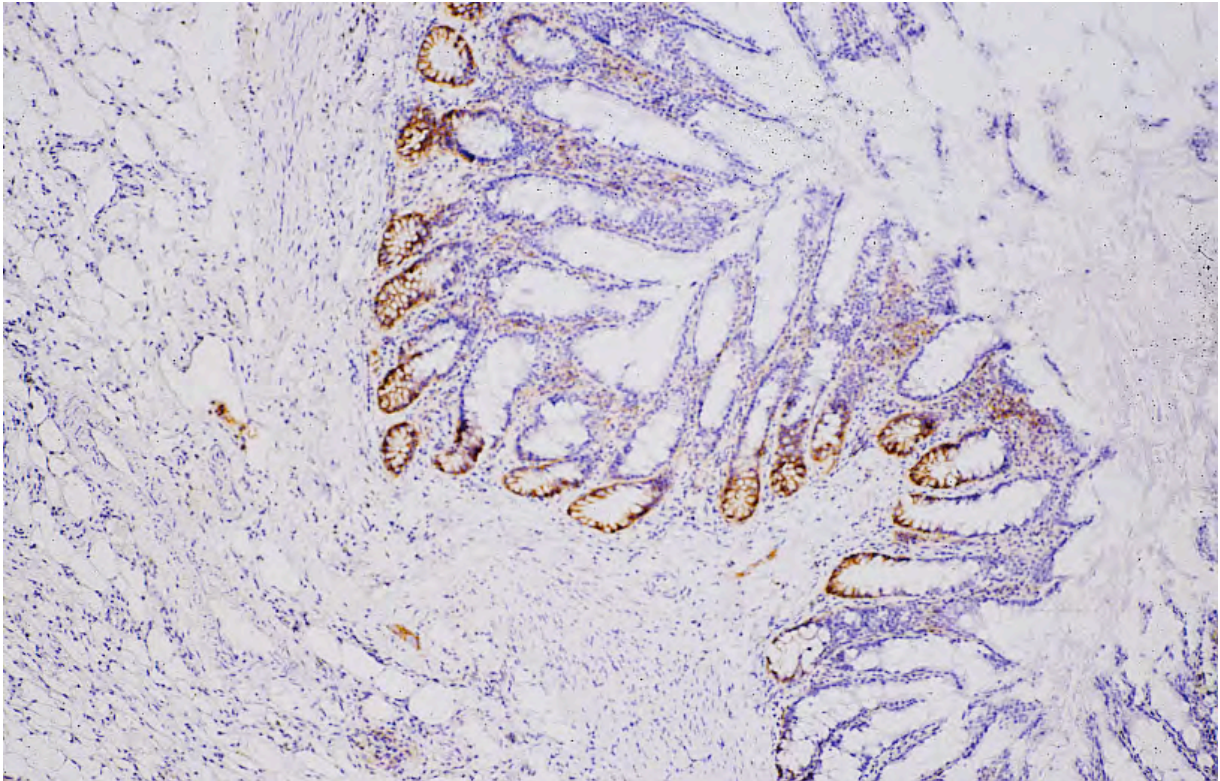


Abbildung 13: CD44 im Darmepithel

CD44 zeigt einen deutlich abfallenden Gradienten in der Expression innerhalb der Krypten von proximal (tief) nach luminal.

Messwertverteilung

Behandlungsgruppe * CD44 Anastomosen

Kreuztabelle

			CD44 Anastomosen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Interceed	Anzahl	3	6	6	15
		% von Behandlungsgruppe	20,0%	40,0%	40,0%	100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl	1	7	7	15
		% von Behandlungsgruppe	6,7%	46,7%	46,7%	100,0%
Gesamt		Anzahl	4	13	13	30
		% von Behandlungsgruppe	13,3%	43,3%	43,3%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	1,154 ^a	2	,562
Likelihood-Quotient	1,200	2	,549
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,00.

Kreuztabelle

			CD44 Anastomosen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Intergel	Anzahl		8	7	15
		% von Behandlungsgruppe		53,3%	46,7%	100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl	1	7	7	15
		% von Behandlungsgruppe	6,7%	46,7%	46,7%	100,0%
Gesamt		Anzahl	1	15	14	30
		% von Behandlungsgruppe	3,3%	50,0%	46,7%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	1,067 ^a	2	,587
Likelihood-Quotient	1,453	2	,484
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,50.

Kreuztabelle

			CD44 Anastomosen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Kontrolle	Anzahl % von Behandlungsgruppe	1 6,7%	7 46,7%	7 46,7%	15 100,0%
	Laparotomie Taurolin	Anzahl % von Behandlungsgruppe	1 6,7%	7 46,7%	7 46,7%	15 100,0%
Gesamt		Anzahl % von Behandlungsgruppe	2 6,7%	14 46,7%	14 46,7%	30 100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,000 ^a	2	1,000
Likelihood-Quotient	,000	2	1,000
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,00.

CD44 findet sich in allen Behandlungsgruppen maßgeblich in mittelstarkem und starkem Expressionsmuster auf den Kolonepithelien. Es ließen sich keine relevanten Unterschiede in den einzelnen Behandlungsgruppen feststellen. Eine statistisch signifikante Aussage lässt sich nicht treffen.

Messung von β_1 -Integrin auf dem Epithel der Kolonanastomosen

β_1 -Integrin stellt sich im immunhistochemischen Nachweis wie in folgendem Beispiel dar:

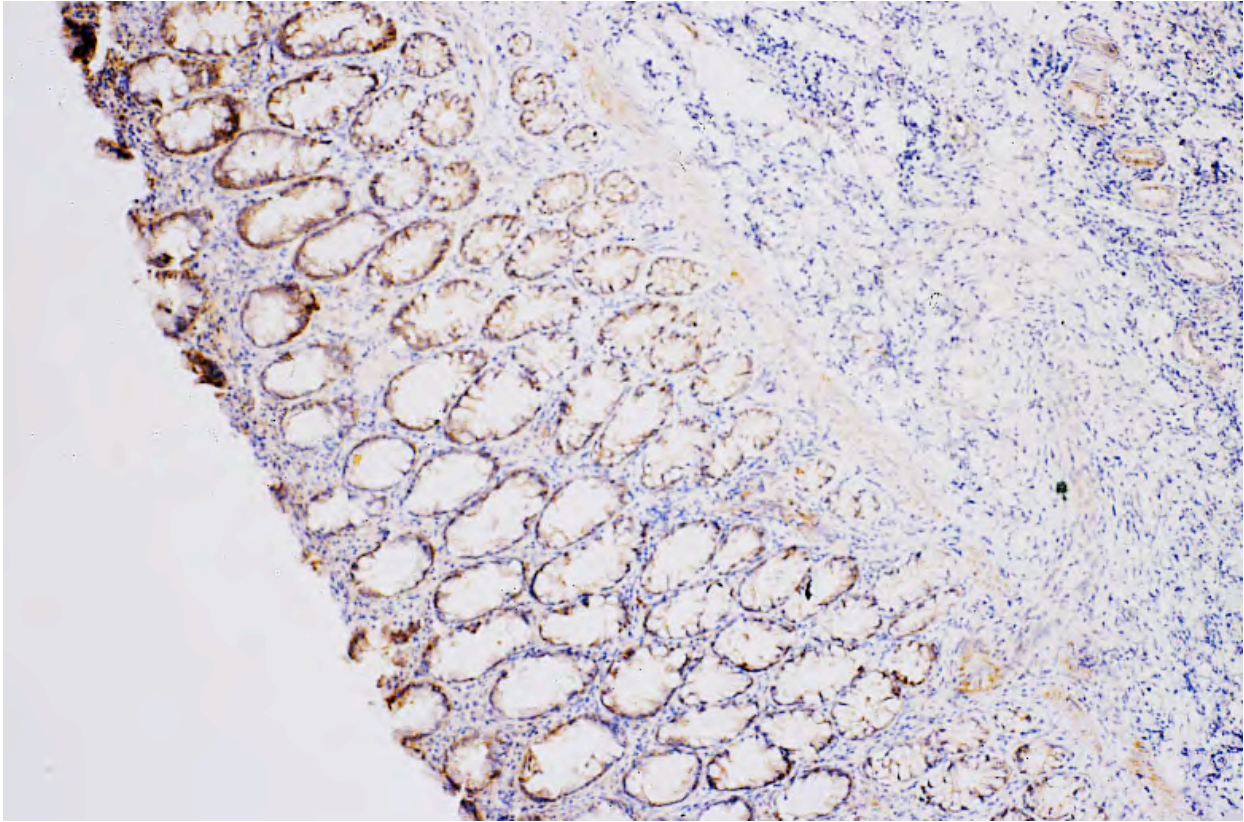


Abbildung 14: Anfärbung von β_1 -Integrin in der Darmschleimhaut in hundertfacher Vergrößerung. Die durch das Detektionssystem an den Primärantikörper gebundene Peroxidase führt durch Reaktion mit dem Chromogen (DAB) zu einer bräunlichen Anfärbung des Antigens

Messwertverteilung

Behandlungsgruppe * B1-Integrin Anastomosen

Kreuztabelle

			B1-Integrin Anastomosen				Gesamt
			negative	weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Interceed	Anzahl	1	7	7		15
		% von Behandlungsgruppe	6,7%	46,7%	46,7%		100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl		8	5	2	15
		% von Behandlungsgruppe		53,3%	33,3%	13,3%	100,0%
Gesamt		Anzahl	1	15	12	2	30
		% von Behandlungsgruppe	3,3%	50,0%	40,0%	6,7%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	3,400 ^a	3	,334
Likelihood-Quotient	4,560	3	,207
Anzahl der gültigen Fälle	30		

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,50.

Kreuztabelle

			B1-Integrin Anastomosen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Intergel	Anzahl	5	9	1	15
		% von Behandlungsgruppe	33,3%	60,0%	6,7%	100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl	8	5	2	15
		% von Behandlungsgruppe	53,3%	33,3%	13,3%	100,0%
Gesamt		Anzahl	13	14	3	30
		% von Behandlungsgruppe	43,3%	46,7%	10,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,168 ^a	2	,338
Likelihood-Quotient	2,197	2	,333
Anzahl der gültigen Fälle	30		

a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,50.

Kreuztabelle

			B1-Integrin Anastomosen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Kontrolle	Anzahl	8	5	2	15
		% von Behandlungsgruppe	53,3%	33,3%	13,3%	100,0%
	Laparotomie Taurolin	Anzahl	6	7	2	15
		% von Behandlungsgruppe	40,0%	46,7%	13,3%	100,0%
Gesamt		Anzahl	14	12	4	30
		% von Behandlungsgruppe	46,7%	40,0%	13,3%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,619 ^a	2	,734
Likelihood-Quotient	,622	2	,733
Anzahl der gültigen Fälle	30		

a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,00.

Bei der Messung von β_1 -Integrin auf den Zellmembranen des Epithels im Bereich der anastomosierenden Kolonanteile stellte sich heraus, dass bei den meisten Tieren entweder ein schwaches oder ein mittelstarkes Expressionsmuster vorherrscht. Es ließen sich weder statistisch signifikante Unterschiede in der Verteilung der Expressionsmuster noch nicht-signifikante Trends in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlungsgruppenzugehörigkeit ausmachen.

Messung von E-Cadherin auf dem Epithel der Kolonanastomosen

Selektive Anfärbung von E-Cadherin exprimierenden Epithelzellen ergibt beispielhaft folgende Bilder:



Abbildung 15: Mittelstarke Anfärbung im E-Cadherin-Nachweis (Tauroilingruppe)

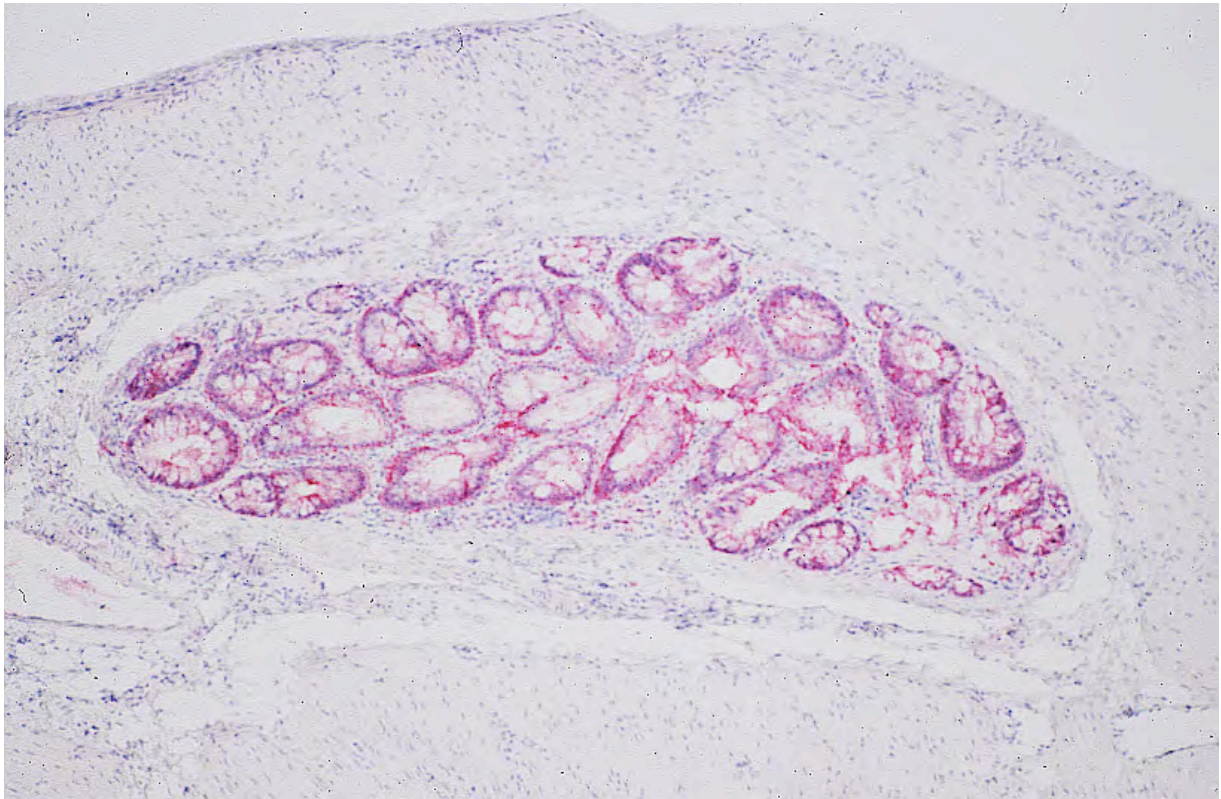


Abbildung 16: Starke Anfärbung im E-Cadherin-Nachweis (Kontrollgruppe)

Messwertverteilung

Behandlungsgruppe * E-Cadherin Anastomosen

Kreuztabelle

			E-Cadherin Anastomosen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Interceed	Anzahl	3	8	4	15
		% von Behandlungsgruppe	20,0%	53,3%	26,7%	100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl	2	5	8	15
		% von Behandlungsgruppe	13,3%	33,3%	53,3%	100,0%
Gesamt		Anzahl	5	13	12	30
		% von Behandlungsgruppe	16,7%	43,3%	40,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,226 ^a	2	,329
Likelihood-Quotient	2,259	2	,323
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,50.

Kreuztabelle

			E-Cadherin Anastomosen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Intergel	Anzahl	4	9	2	15
		% von Behandlungsgruppe	26,7%	60,0%	13,3%	100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl	2	5	8	15
		% von Behandlungsgruppe	13,3%	33,3%	53,3%	100,0%
Gesamt		Anzahl	6	14	10	30
		% von Behandlungsgruppe	20,0%	46,7%	33,3%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,410 ^a	2	,067
Likelihood-Quotient	5,693	2	,058
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,00.

Kreuztabelle

			E-Cadherin Anastomosen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Kontrolle	Anzahl	2	5	8	15
		% von Behandlungsgruppe	13,3%	33,3%	53,3%	100,0%
	Laparotomie Taurolin	Anzahl	6	6	3	15
		% von Behandlungsgruppe	40,0%	40,0%	20,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	8	11	11	30
		% von Behandlungsgruppe	26,7%	36,7%	36,7%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	4,364 ^a	2	,113
Likelihood-Quotient	4,542	2	,103
Anzahl der gültigen Fälle	30		

a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,00.

Bei jedem Tier ließ sich zumindest eine schwache Expression von E-Cadherin nachweisen, weshalb die Spalte für „negativ“ fehlt.

Im Vergleich der Behandlungsgruppe Taurolidin / Heparin mit der Kontrollgruppe fällt ein gehäuftes Auftreten schwachen Expressionsmusters auf. Vierzig Prozent der mit Taurolidin / Heparin behandelten Tiere wiesen eine schwache Expression von E-Cadherin gegenüber 13,3% in der Kontrollgruppe auf. Ebenso ist die Anzahl der Tiere mit starkem Expressionsmuster in der Behandlungsgruppe Taurolidin / Heparin mit zwanzig Prozent deutlich kleiner als in der Kontrollgruppe (53,3%). Hier kann ein Zusammenhang mit der Applikation von Taurolidin / Heparin vermutet werden.

In der Behandlungsgruppe Interceed™ findet sich eine Häufung von mittelstarkem Expressionsmuster (53,3%), während in der Kontrollgruppe nur 33,3% der Tiere mittelstarke Expression zeigen. Hier sind auch weniger Tiere stark E-Cadherin-positiv (26,7%) als in der Kontrollgruppe (53,3%).

Etwas stärker ist dieser Effekt in der Behandlungsgruppe Intergel® wo bei sechzig Prozent der Tiere mittelstarke Expression vorliegt und nur bei 13,3% starke Expression nachgewiesen werden konnte.

Fasst man in der Betrachtung einerseits die Spalten schwach und negativ zusammen und andererseits die Spalten mittelstark und stark, so dass sich jeweils eine Spalte für 0-25% signalpositive Zellen und >25% signalpositive Zellen bilden, und vergleicht nun die beiden resultierenden Summen miteinander, zeigt sich, dass von allen Behandlungsgruppen die Gruppe Taurolidin / Heparin insgesamt das schwächste Expressionsverhalten für E-Cadherin aufweist. Nur sechzig Prozent der Tiere weisen mittelstarke und starke Expression auf, während in der Intergel®-Gruppe 73,3%, in der Interceed™-Gruppe achtzig Prozent und in der Kontrollgruppe sogar 86,6% mittelstark und stark positiv sind.

Da im durchgeführten χ^2 -Test der p-Wert mit 0,113 (Taurolidin versus Kontrolle) größer 0,05 ist, sind die Daten statistisch zwar nicht signifikant, wohl aber kann eine Abhängigkeit der Expression von der Behandlungsgruppe vermutet werden.

Messung von CD44 auf dem Epithel der Metastasen

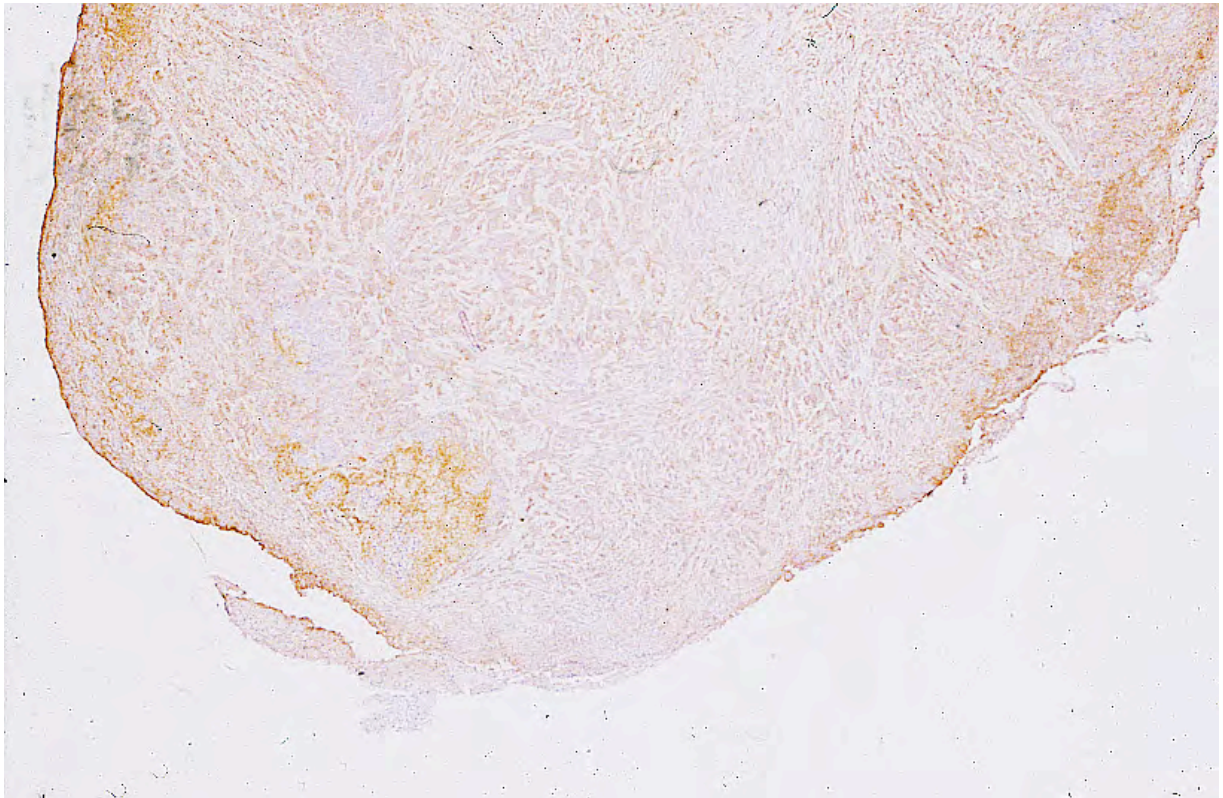


Abbildung 17: Beispielhafte Übersicht einer Metastase mit Nachweis von CD44

Messwertverteilung

Behandlungsgruppe * CD44 Metastasen

Kreuztabelle

			CD44 Metastasen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Interceed	Anzahl	2	8	5	15
		% von Behandlungsgruppe	13,3%	53,3%	33,3%	100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl		12	3	15
		% von Behandlungsgruppe		80,0%	20,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	2	20	8	30
		% von Behandlungsgruppe	6,7%	66,7%	26,7%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	3,300 ^a	2	,192
Likelihood-Quotient	4,083	2	,130
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 4 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,00.

Kreuztabelle

			CD44 Metastasen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Intergel	Anzahl	3	4	8	15
		% von Behandlungsgruppe	20,0%	26,7%	53,3%	100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl		12	3	15
		% von Behandlungsgruppe		80,0%	20,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	3	16	11	30
		% von Behandlungsgruppe	10,0%	53,3%	36,7%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	9,273 ^a	2	,010
Likelihood-Quotient	10,703	2	,005
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,50.

Kreuztabelle

			CD44 Metastasen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Kontrolle	Anzahl % von Behandlungsgruppe		12 80,0%	3 20,0%	15 100,0%
	Laparotomie Taurolin	Anzahl % von Behandlungsgruppe	3 20,0%	8 53,3%	4 26,7%	15 100,0%
Gesamt		Anzahl % von Behandlungsgruppe	3 10,0%	20 66,7%	7 23,3%	30 100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	3,943 ^a	2	,139
Likelihood-Quotient	5,108	2	,078
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 4 Zellen (66,7%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,50.

In keiner Behandlungsgruppe fanden sich signalnegative Metastasen. In der Kontrollgruppe zeigt die große Mehrheit der Metastasen (achtzig Prozent) mittelstarkes und der Rest (zwanzig Prozent) starkes Expressionsmuster. Die größte Anzahl signalschwacher Zellen wurden in den Behandlungsgruppen Taurolidin / Heparin und Intergel® nachgewiesen. Allerdings zeigt sich in der Intergel®-Gruppe auch gleichzeitig die größte Anzahl signalstarker Zellen.

Am ehesten lässt sich im Vergleich der Taurolin- / Heparin-Gruppe mit der Kontrollgruppe ein Unterschied erkennen. Die Taurolin- / Heparin-Gruppe hat von allen Beobachtungsgruppen die kleinste Anzahl starkpositiver Metastasen und mit der Intergel®-Gruppe gemeinsam die größte Anzahl an signalschwacher Metastasen. Die Unterschiede erreichten jedoch nur in der Behandlungsgruppe Intergel ein statistisch signifikantes Niveau (p=0,01) und nicht in der Behandlungsgruppe Taurolidin / Heparin.

Messung von β_1 -Integrin auf dem Epithel der Metastasen

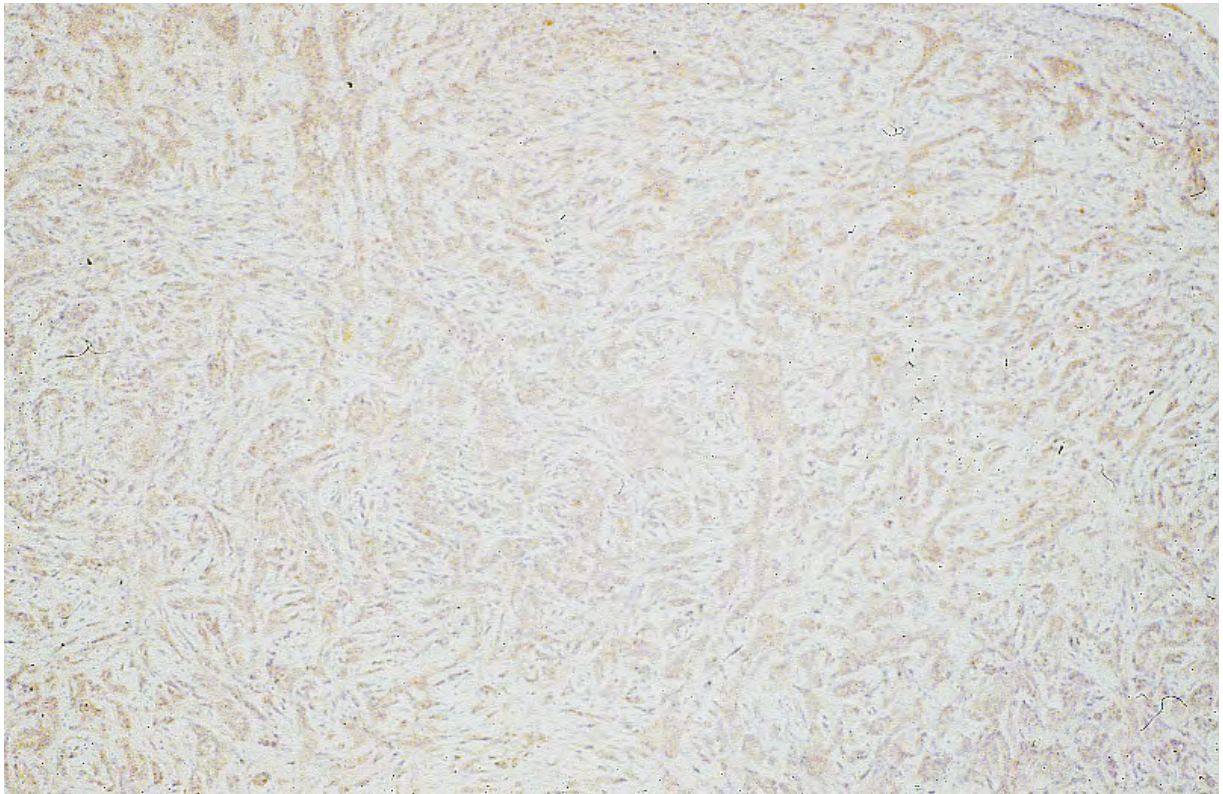


Abbildung 18: Ausschnitt einer Metastase mit Nachweis von β_1 -Integrin (Vergrößerung 100-fach)

Messwertverteilung

Behandlungsgruppe * B1-Integrin Metastasen

Kreuztabelle

			B1-Integrin Metastasen				Gesamt
			negative	weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Interceed	Anzahl % von Behandlungsgruppe	1 6,7%	3 20,0%	7 46,7%	4 26,7%	15 100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl % von Behandlungsgruppe		3 20,0%	5 33,3%	7 46,7%	15 100,0%
Gesamt		Anzahl % von Behandlungsgruppe	1 3,3%	6 20,0%	12 40,0%	11 36,7%	30 100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,152 ^a	3	,542
Likelihood-Quotient	2,550	3	,466
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,50.

Kreuztabelle

			B1-Integrin Metastasen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Intergel	Anzahl % von Behandlungsgruppe	5 33,3%	7 46,7%	3 20,0%	15 100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl % von Behandlungsgruppe	3 20,0%	5 33,3%	7 46,7%	15 100,0%
Gesamt		Anzahl % von Behandlungsgruppe	8 26,7%	12 40,0%	10 33,3%	30 100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,433 ^a	2	,296
Likelihood-Quotient	2,486	2	,289
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,00.

Kreuztabelle

			B1-Integrin Metastasen				Gesamt
			negative	weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Kontrolle	Anzahl % von Behandlungsgruppe		3 20,0%	5 33,3%	7 46,7%	15 100,0%
	Laparotomie Taurolin	Anzahl % von Behandlungsgruppe	2 13,3%	2 13,3%	6 40,0%	5 33,3%	15 100,0%
Gesamt		Anzahl % von Behandlungsgruppe	2 6,7%	5 16,7%	11 36,7%	12 40,0%	30 100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,624 ^a	3	,453
Likelihood-Quotient	3,400	3	,334
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,00.

Bei der Messung von β_1 -Integrin auf den Zellen der intraperitonealen Metastasen fanden sich folgende Ergebnisse:

Nur in der Kontrollgruppe überwiegt das starke Expressionsmuster mit 46,7%. In den Beobachtungsgruppen hingegen zeigte sich eine Häufung von mittelstarker Expression (Interceed™ und Intergel® jeweils 46,7%, Taurolidin / Heparin vierzig Prozent).

Signalnegative Metastasen fanden sich nur in den Behandlungsgruppen Interceed™ (in 6,7% der Tiere) und am häufigsten in der mit Taurolidin / Heparin behandelten Gruppe (13,3%).

Ein relevantes statistisches Signifikanzniveau ergab sich nicht (p=0,05).

Messung von E-Cadherin auf dem Epithel der Metastasen

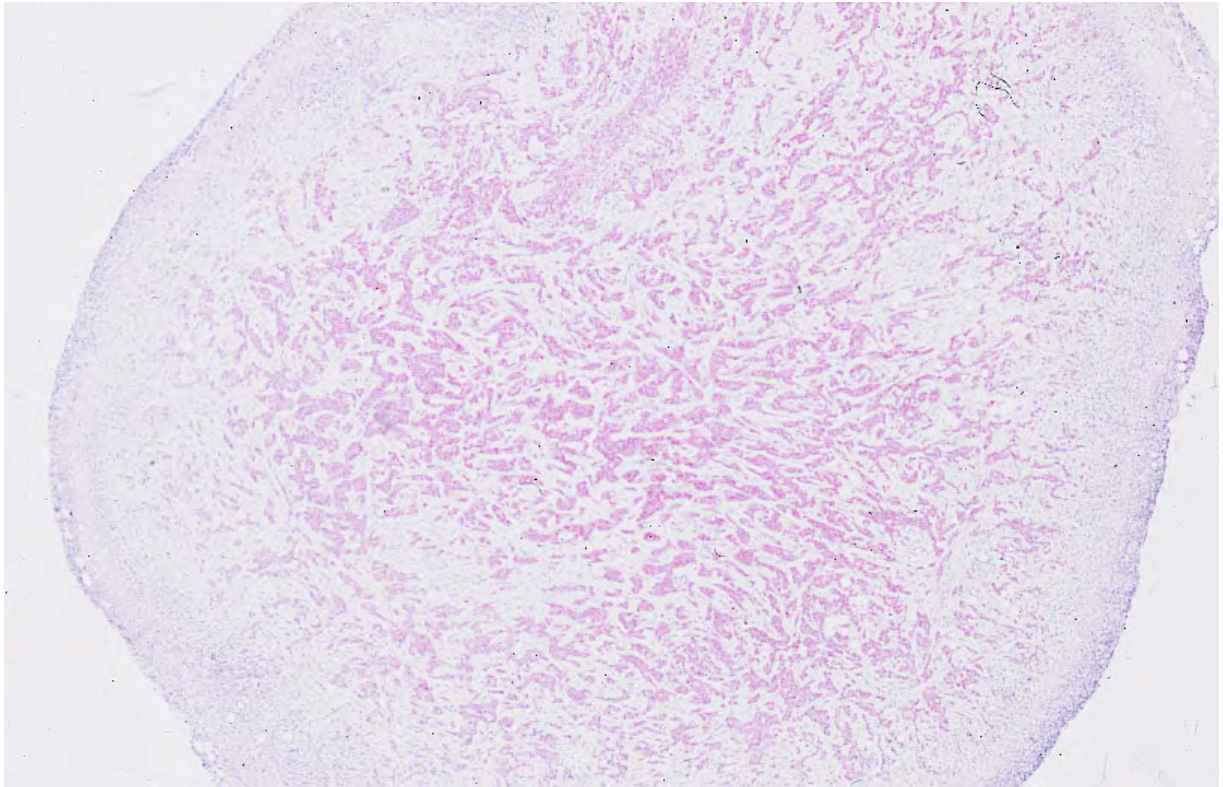


Abbildung 19: Übersicht über eine Metastase mit Nachweis von E-Cadherin

Messwertverteilung

Behandlungsgruppe * E-Cadherin Metastasen

Kreuztabelle

			E-Cadherin Metastasen				Gesamt
			negative	weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Interceed	Anzahl	3	2	8	2	15
		% von Behandlungsgruppe	20,0%	13,3%	53,3%	13,3%	100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl		1	8	6	15
		% von Behandlungsgruppe		6,7%	53,3%	40,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	3	3	16	8	30
		% von Behandlungsgruppe	10,0%	10,0%	53,3%	26,7%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,333 ^a	3	,149
Likelihood-Quotient	6,592	3	,086
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 6 Zellen (75,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,50.

Kreuztabelle

			E-Cadherin Metastasen			Gesamt
			weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Intergel	Anzahl	5	4	6	15
		% von Behandlungsgruppe	33,3%	26,7%	40,0%	100,0%
	Laparotomie Kontrolle	Anzahl	1	8	6	15
		% von Behandlungsgruppe	6,7%	53,3%	40,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	6	12	12	30
		% von Behandlungsgruppe	20,0%	40,0%	40,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	4,000 ^a	2	,135
Likelihood-Quotient	4,270	2	,118
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a. 2 Zellen (33,3%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,00.

Kreuztabelle

			E-Cadherin Metastasen				Gesamt
			negative	weak	moderate	strong	
Behandlungsgruppe	Laparotomie Kontrolle	Anzahl % von Behandlungsgruppe		1 6,7%	8 53,3%	6 40,0%	15 100,0%
	Laparotomie Taurolin	Anzahl % von Behandlungsgruppe	4 26,7%	6 40,0%	4 26,7%	1 6,7%	15 100,0%
Gesamt		Anzahl % von Behandlungsgruppe	4 13,3%	7 23,3%	12 40,0%	7 23,3%	30 100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	12,476 ^a	3	,006
Likelihood-Quotient	14,829	3	,002
Anzahl der gültigen Fälle	30		

^a 6 Zellen (75,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5.
Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,00.

Die Messung von zellmembrangebundenem E-Cadherin auf den Zellen der Metastasen zeigte folgende Ergebnisse:

In der Kontrollgruppe findet sich (wie in der Behandlungsgruppe Intergel®) die größte Anzahl signalstarker (vierzig Prozent) und die kleinste Anzahl negativer (keine) und signalschwacher (6,7%) Metastasen. In der Intergel®-Gruppe ist die Anzahl signalschwacher Metastasen (33,3%) gegenüber der Kontrollgruppe höher, jedoch finden sich auch in dieser Gruppe keine signalnegativen Metastasen.

Lediglich in der Interceed™- (zwanzig Prozent) und noch mehr in der Taurolidin- / Heparin-Gruppe (26,7%) kamen signalnegative Metastasen vor. Gleichzeitig findet sich in der Taurolidin- / Heparin-Gruppe die kleinste Anzahl von Metastasen mit starkem Expressionsmuster (6,7%). Ebenso lässt sich in der Intergel®-Gruppe eine relativ geringe Anzahl (13,3%) stark E-Cadherin exprimierender Zellen nachweisen.

Fasst man wieder einerseits die Spalten „negative“ und „weak“ zusammen und stellt sie den zusammengefassten Spalten „moderate“ und „strong“ gegenüber lassen sich folgende Aussagen treffen:

In 66.7% der mit Taurolidin / Heparin behandelten Tiere wiesen die Tumormetastasen bei unserer Untersuchung überhaupt keine oder schwache Expression von E-Cadherin auf gegenüber nur 6,7% in der Kontrollgruppe. In den Gruppen Interceed™ und Intergel® sind in jeweils 33,3% der Tiere die Metastasen „negative“ oder „weak“.

Gleichzeitig ist die Anzahl an mittelstarker und starker Expression zeigenden Metastasen in der Taurolidin- / Heparin-Gruppe mit 33,4% um fast zwei Drittel gegenüber der Anzahl in der Kontrollgruppe (93,3%) und um ca. die Hälfte gegenüber der Interceed™-Gruppe (76,6%) und der Intergel®-Gruppe (66,7%) reduziert.

Aufgrund statistischer Signifikanz im χ^2 -Test ($p=0.006$) kann die Nullhypothese zugunsten der Alternativhypothese bei dieser Messung verworfen werden.

Diskussion

Der Einfluss von Intergel®

Makroskopische Auswertung

Die intraperitoneale Applikation von Intergel® führt nicht zu einer statistisch signifikanten, makroskopischen Abnahme der Tumorgesamtmasse in unserem Modell. Die Wirkung von Hyaluronsäure ist bislang wenig erforscht. Während bei Matsui et al. ein wachstumsfördernder Einfluss gezeigt wurde¹⁰⁷, konnten 2008 Sohn et al. in einer klinischen, in-vivo-Untersuchung an achtzehn Patienten mit gastrointestinalen Tumoren keinen Zusammenhang nachweisen¹⁰⁸. In unserem Modell findet sich kein Hinweis für einen tumorsupprimierenden oder wachstumsfördernden Effekt von Intergel®.

CD44

CD44 ist der natürliche Ligand von Hyaluronsäure. Intergel® dürfte somit an den oberflächenständigen Rezeptor binden. Möglicherweise wird hierdurch die adhäsionsvermittelnde Wirkung von CD44 kompetitiv für die Dauer der Rezeptorblockade inhibiert. Matsui et al. weisen im Mausmodell mit Kolonadenokarzinomzellen eine verstärkte Expression von CD44 durch Applikation von Hyaluronsäure und verstärktes Tumorwachstum nach¹⁰⁷. Unsere Arbeit konnte keine statistisch signifikante Alteration in der Expression von CD44 nach Applikation von Intergel® nachweisen.

β_1 -Integrin

Unterschiedliche Arbeiten zeigen einen Einfluss von Intergel[®] auf die Bildung postoperativer Adhäsionen^{25,28,32,33}. In keiner Arbeit wurde jedoch bisher ein Einfluss auf die Expression von β_1 -Integrin gemessen. Unsere Arbeit konnte keinen Einfluss nachweisen. Ob der verwendete immunhistochemische Nachweis nicht sensitiv genug ist, die Stichprobenzahl zu gering ist oder tatsächlich kein Einfluss besteht, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden. Eine spekulative These könnte darin bestehen, dass nicht die Expression verändert, wohl aber die Aktivität, dass also das Molekül an der Zelloberfläche persistiert und immunhistochemisch nachweisbar bleibt. So ein Effekt wurde unter anderem für Teratokarzinomzellen¹⁰⁹, Keratinocyten¹¹⁰ und retinale Neuronen¹¹¹ nachgewiesen. Allerdings besteht außer der rein hypothetischen Möglichkeit kein Grund zu der Annahme, dass dieser Effekt in unserer Arbeit eine Rolle spielt, da in den genannten Fällen das Integrin durch Phosphorylierung inaktiviert wird, was bei allen dreien von uns untersuchten Therapien kein zu vermutender Mechanismus ist.

Intergel[®] wurde von uns in einer körperrgewichtsadaptierten Dosierung analog zur in der Gynäkologie etablierten Weise angewendet¹¹². Es liegen zwar hinreichend Untersuchungen zur Pharmakokinetik beim Menschen vor, ob jedoch für einen vergleichbaren Effekt bei Ratten ein anderes Protokoll etabliert werden müsste, kann nicht gesagt werden.

E-Cadherin

Eine Interaktion von Hyaluronsäure und E-Cadherin wurde bislang in keiner Arbeit beobachtet. Eine Arbeit zeigt zumindest eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Bindungsstärke von E-Cadherin und der von CD44 im murinen Mammakarzinommodell¹¹³. Unsere Untersuchung lässt

ebenfalls keinen Rückschluss auf einen Einfluss zu. Die immunhistochemisch nachweisbare Expression von E-Cadherin wurde durch die Applikation von Intergel[®] nicht beeinflusst.

Der Einfluss von Interceed™

Interceed™ ist eine mechanische Barriere aus Zellulose. In unserer Arbeit konnte keine statistisch signifikante, makroskopische Reduktion der Tumorgesamtmasse nachgewiesen werden. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da in unserem Modell die ausgesetzten Tumorzellen problemlos die nicht mit Interceed™ abgedeckten peritonealen Stellen erreichten und dort proliferieren konnten.

Zellulose ist abgesehen von ihrer Resorbierbarkeit weitgehend biochemisch inert. Ein Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen wurde nie beobachtet und konnte auch in unserer Studie erwartungsgemäss nicht nachgewiesen werden.

Der Einfluss von Taurolidin / Heparin

Makroskopische Tumorreduktion

In unserer Studie konnte die makroskopische Verminderung der Tumormasse nach Applikation von Taurolidin / Heparin gezeigt werden. Eine Vielzahl von Arbeiten liefert unterschiedliche Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen. Ein bedeutender Mechanismus ist die direkte Hemmung von Interleukin-1 β -Produktion in Monozyten des peripheren Blutes und in Peritonealmakrophagen^{63,64,71}, wodurch den Tumorzellen ein wachstumsfördernder Stimulus entzogen werden könnte. IL-1 β nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zellteilung ein und ist einer der

Hauptstimuli für das Zellwachstum *in vivo*¹¹⁴, insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass während peritonealer Reizzustände infolge Infektion oder auch nach abdominalchirurgischen Eingriffen physiologischerweise die Serumkonzentration von IL-1 β (neben IL-6 und TNF- α) deutlich über die systemische Serumkonzentration ansteigt^{115,116} und somit die Wachstumsvoraussetzungen für Tumorzellen sehr gut sind. In einem weiteren Schritt führt die Normalisierung der TNF- α - und IL-1 β -Spiegel durch Applikation von Taurolidin konsekutiv zu einer verminderten Synthese von VEGF und damit einer Reduktion der Neoangiogenese sowie von TGF- β , was zur Verhinderung von Mikrometastasen beitragen könnte.

Taurolidin induziert Apoptose bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Tumorzellreihen (Kolonkarzinom, Glioblastom, Ovarialkarzinom, hämatoonkologische Zellreihen, Melanom, Prostatakarzinom...) ^{72,117-122} durch Eingriffe in mehrere Prozessniveaus der apoptotischen Kaskade, angefangen an der Zelloberfläche (Übertragung aktivierter Methylgruppen auf die Tyrosinkinase- und Fas-Rezeptoren)¹²³, innerhalb der intrazellulären Kaskade selbst (Aktivierung der Caspasen 3,8 und 9)¹²¹, bis hin zur Cytochrom-C-vermittelten mitochondrialen Schädigung¹²⁰.

Taurolidin führt zu einer verminderten Adhärenzfähigkeit von unterschiedlichen Bakterien zur Wirtszelle innerhalb von vier Minuten durch Zerstörung von Flagellen und Fimbrien¹²⁴⁻¹²⁶. Dieser Effekt tritt bereits bei subbakterizider Dosierung auf. Es stellt sich die Frage, inwiefern auch die antineoplastisch genutzte Wirkung von Taurolidin auf einer Verminderung der Adhärenzfähigkeit von Tumorzellen beruht und ob, beziehungsweise

welche Adhäsionsmoleküle wie durch die Applikation der Substanz in vivo beeinflusst werden.

Die Wirkung dieser neuen Substanz wird für die einzelnen untersuchten Adhäsionsmoleküle separat diskutiert.

CD44 auf dem Epithel der Metastasen

In unserer Untersuchung zeigt sich eine verminderte Expression von CD44 nach Applikation von Taurolidin / Heparin. Es besteht keine statistische Signifikanz.

Die Rolle von CD44 in der Metastasierung von Tumoren ist nicht vollständig geklärt. Erschwerend ist der Umstand, dass CD44 in einer Vielzahl alternativer Splicing-Varianten auftritt und unterschiedliche Membranproteine mit unterschiedlichen Funktionen entstehen. Die meisten Untersuchungen führen für das kolorektale Karzinom eine Korrelation zwischen schlechter Prognose und starker Expression auf^{84,127-138}. Ngan et al. finden 2007 jedoch immunhistopathologisch schwache Expression von CD44 und / oder E-Cadherin in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose insbesondere beim kolorektalen Karzinom. Insbesondere der Verlust beider Adhäsionsmoleküle hatte den stärksten Einfluss auf eine schlechte Prognosestellung¹³⁹. Ganz offensichtlich geht aus der vorliegenden Literatur hervor, dass nicht die von uns untersuchte Expressionsstärke von CD44 von Bedeutung für die Evaluation der Malignität von Zellen ist, sondern vielmehr das Expressionsmuster der unterschiedlichen Isoformen.

Die von uns gezeigte Reduktion der Expression nach Applikation von Taurolidin / Heparin ist auf die direkte Hemmung der Proteinbiosynthese zurückzuführen⁶⁷. Darüberhinaus ist eine indirekte Hemmung der

72

Expression von CD44 durch Hemmung von TNF- α durch Taurolidin möglich. TNF- α stimuliert konzentrationsabhängig die Bildung von CD44¹⁴⁰⁻

143

CD44 auf dem Epithel der Darmanastomose

CD44 findet sich in allen Behandlungsgruppen maßgeblich in mittelstarkem und starkem Expressionsmuster auf den Kolonepithelien. Es ließen sich keine relevanten Unterschiede in den einzelnen Behandlungsgruppen feststellen. Eine statistisch signifikante Aussage lässt sich nicht treffen.

Ein geringgradiger, inhibierender Einfluss infolge Hemmung der Proteinbiosynthese durch Taurolidin könnte unterhalb der Nachweisgrenze unserer Methode bestehen (siehe Kapitel: β_1 -Integrin auf dem Epithel der Darmanastomose).

β_1 -Integrin auf dem Epithel der Metastasen

Unsere Arbeit zeigt allenfalls eine leichte Verminderung der Expression unter den von uns untersuchten Behandlungen, vor allem in der Gruppe der mit Taurolidin / Heparin behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine statistische Signifikanz liegt nicht vor. Der Zusammenhang zwischen der Expression von β_1 -Integrin und Tumoraggressivität oder Metastasierungsneigung ist komplex. β_1 -Integrin ist in Tumoren an einer Vielzahl von interzellulären Kommunikationen beteiligt wie z.B. Regulierung der Zellteilung, der Metastasierung und der Angiogeneese. Es bildet einen Teil der tumorspezifischen Antigenität, reguliert als Teil einiger von vielen Signaltransduktionswegen den Zellzyklus und entscheidet mit über den Ausweg in den programmierten Zelltod¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Eine an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisierte fokale Adhäsionskinase (pp125FAK) bindet an Integrine und

greift durch Phosphorylierung in eine Vielzahl von Regulationswegen der zellulären Homöostase ein. Dieses Molekül ist unter anderem erforderlich für die onkogene Transformation und Invasion welche in vitro und in vivo durch ErbB2/3 induziert wird¹⁴⁷. Eine frühe Arbeit von 1994 zeigt eine erhöhte Expression von β_1 -Integrin bei Subklonen von humanen Kolonkarzinomzellen mit malignerem Charakter¹⁴⁸ im Vergleich zu anderen Zellreihen geringerer Malignität. Hohe Expression von $\alpha_5\beta_1$ -Integrin korreliert mit hoher Invasivität einer Kolonkarzinomzelllinie¹⁴⁹. Unterschiedliche Zellreihen weisen in vielen Arbeiten jeweils unterschiedliche Korrelationen zwischen Zellproliferation und Expression auf: so korreliert die Expression von $\alpha_2\beta_1$ -Integrin (=“very late antigen“ VLA-2) auf humanen Rhabdomyosarkomzellen sowohl mit verstärkter Adhäsion an Kollagen und Laminin als auch mit einer vergrößerten Metastasenanzahl in Nacktmäusen¹⁵⁰. Expression von $\alpha_5\beta_1$ -Integrin hingegen ist in der Lage, bei HT29-Kolonkarzinomzellen einen Wachstumsstopp durch Induktion von „growth arrest gene 1“ (gas-1) und Blockade der Transkription der proto-Onkogene c-fos, c-jun und jun-B in vitro hervorzurufen. In Anwesenheit von Fibronektin wird sowohl die Inhibition von gas-1 als auch die Blockade der genannten „immediate early genes“ aufgehoben, was in einer deutlich gesteigerten Proliferation der Zellen resultiert¹⁵¹.

β_1 -Integrin auf dem Epithel der Darmanastomose

Die Expressionsstärke zeigt keine Unterschiede in Abhängigkeit der von uns untersuchten Behandlungen. Ein immunhistochemisch messbarer Einfluss scheint nicht zu bestehen. Ein im vorangegangenen Kapitel diskutierter Einfluss von Taurolidin / Heparin auf die Expression von β_1 -

Integrin könnte trotzdem bestehen. Taurolidin ist ein Inhibitor der Proteinbiosynthese (siehe oben)⁶⁷. Gehen wir davon aus, dass entdifferenzierte Karzinomzellen einen höheren Protein-Turnover besitzen, könnten diese auch vulnerabler auf eine Inhibition reagieren. Somit könnte ein schwächerer Einfluss von Taurolin auf die Expression von β_1 -Integrin auch auf gesundem Kolonepithel mit geringerem Proteinumsatz als entartete Zellen bestehen. Dieser Einfluss läge dann unterhalb der Nachweisgrenze unserer semiquantitativen Methode.

E-Cadherin auf dem Epithel der Metastasen

Unter dem Einfluss von Taurolidin / Heparin fanden sich auf den Zelloberflächen der Metastasen im Vergleich mit der Kontrollgruppe deutlich seltener Expressionsmuster der Kategorie „strong“ (6.7%). Dagegen ist die Anzahl signalnegativer Zellen in der mit Taurolidin behandelten Gruppe mit 26% deutlich höher. Bei nachgewiesener statistischer Signifikanz ($p=0,006$) kann hier ein Einfluss vermutet werden. Es ist seit langem bekannt, dass E-Cadherin eine Schlüsselrolle im Prozess der Metastasierung unterschiedlicher Tumoren spielt¹⁵². Bereits in früheren Untersuchungen, welche dasselbe Tumormodell bei der Ratte verwendeten, ist nachgewiesen worden, dass es unter dem Einfluss von Taurolidin makroskopisch zu einer Reduktion der Metastasengsamtmasse kommt^{14,28,65,68,69,153}.

E-Cadherin ist ein Oberflächenmolekül, welches die homonyme Adhäsion von gleichartigen Zellen vermittelt, so dass eine Abnahme der Oberflächendichte am ehesten mit einer erhöhten Neigung zur Lockerung des Zellverbandes einhergehen sollte. In mehreren Studien wurde die Downregulation der Expression von E-Cadherin bei metastasierenden Tumorzellverbänden als einen entscheidenden Schritt auf dem Weg zur

Lösung einzelner vitaler Zellen aus dem Verband beschrieben, vereinzelt wird sogar von einer negativen Korrelation zwischen der E-Cadherin-Expression eines Tumors und seinem metastatischen Potential gesprochen¹⁵². Das E-Cadherin-assoziierte Zelladhäsionssystem wird heute als „Invasionssuppressionssystem“ in Krebszellen angesehen¹⁵⁴. Unterschiedliche Tumoren weisen dann eine erhöhte Invasivität und eine Entdifferenzierung auf, wenn ein funktioneller Verlust von E-Cadherin an der Zelloberfläche besteht¹⁵⁵⁻¹⁶⁰. Es wird vermutet, dass Karzinomzellen während der Invasion eine „mesenchymale Phase“ durchleben, wie dies auch gesunde, epitheliale Zellen während der Entwicklung tun. Eine Korrelation zwischen dem histologischen Entdifferenzierungsgrad, der Dukes-Klassifikation eines Kolonkarzinoms und der immunhistochemischen Anfärbbarkeit von E-Cadherin an paraffinfixierten Präparaten scheint zu bestehen¹⁶¹. E-Cadherin besitzt darüber hinaus eine Protein-p27-vermittelte wachstumssupprimierende Wirkung¹⁶².

Unsere Arbeit findet hingegen keine Bestätigung für die vorangehend genannten Mechanismen. Einige Arbeiten stützen Zweifel an den oben genannten Zusammenhängen^{163,164}. Welche Bedeutung die Reduzierung der Expression nach Behandlung mit Taurolidin in unserer Studie hat, ist aus dieser Untersuchung nicht ersichtlich. Wie oben beschrieben induziert Taurolidin die Apoptose. Hierbei wird E-Cadherin durch Caspase-3 in zwei Fragmente gespalten und das c-terminale Fragment in das Zytoplasma transloziert. Damit wird die zelluläre Adhäsionsverbindung aufgehoben^{165,166}. Adhäsionsmoleküle werden durch Recycling aus der Plasmamembran und Proteolyse während der Apoptose reguliert. Bei einigen Apoptose-pathways führt eine Caspase-7-vermittelte O-Glykosylierung der zytoplasmatischen E-Cadherin-Domäne zur Lösung vom p120-Catenin (während die Bindungen zum β - und γ -Catenin erhalten

bleiben)¹⁶⁷. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Präsenz von oberflächenständigem E-Cadherin über andere, bislang unbekannte Mechanismen von existenzieller Bedeutung für das Tumorwachstum oder –überleben ist und dass von den Tumorzellen versucht wird, dem apoptose- und / oder nekroseinduzierenden Effekt der Taurolidinapplikation^{72,117-121} zumindest teilweise durch Upregulation der E-Cadherin-Expression gegenzusteuern. Diese Überlegung wurde jedoch noch durch keine einzige Arbeit untersucht und untermauert.

Die Idee, dass E-Cadherin weitere physiologische wie pathologische Funktionen als Zell-Zell-Kontaktvermittlung übernimmt ist nicht neu¹⁶⁸ und legt nahe, dass zur Aufklärung der Pathomechanismen bei dem Vorgang der Metastasierung weitere Forschung notwendig sein wird.

E-Cadherin auf dem Epithel der Darmanastomose

Die Messung der Expression von E-Cadherin auf dem Epithel der Kolonanastomosen zeigt eine Abschwächung nach Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wesentlich weniger Tiere zeigten ein starkes Expressionsmuster, während deutlich mehr Tiere das Antigen nur noch schwach exprimierten. Trotz fehlender statistischer Signifikanz kann hier ein Zusammenhang vermutet werden. Taurolidin wirkt inhibitorisch auf die Proteinbiosynthese durch Hemmung der Translation ohne Wirkung auf die Transkription⁶⁷, so dass die generalisiert verminderte Nachweisbarkeit von allen untersuchten Oberflächenantigenen in der Taurolidin- / Heparin-Gruppe unserer Studie nicht überrascht. Ebenso ist die verminderte Tumormasse in dieser Gruppe sicher zu einem Teil auf diese Verminderung der Proteinbiosynthese zurückzuführen. Inwiefern der inhibitorische Einfluss auf die Translation stärker bei Karzinomzellen ist, welche eine allgemein höhere Proteinbiosyntheserate aufweisen als

gesunde Zellen, ist bislang nicht vergleichend untersucht worden. Es ist jedoch anzunehmen, dass Karzinomzellen aufgrund ihres erhöhten Proteinumsatzes möglicherweise vulnerabler auf eine Hemmung der Biosynthese reagieren als gesundes Epithel.

Zusammenfassung

Peritoneale Metastasenbildung stellt in der abdominalen Tumorchirurgie trotz immer ausgefeilterer Operationstechniken (En-bloc-Resektion, grössere Sicherheitsabstände, sorgfältige prä- und intraoperative Identifikation von Lymphknotenmetastasen...), suffizienter neoadjuvanter Chemotherapiestrategien und zunehmender Erfahrung nach wie vor ein grosses Rezidivrisiko dar. Durch operative Manipulation am Tumor kommt es sehr schnell zur Aussaat von Zellen, welche in der Lage sind, Metastasen zu bilden und eine operativ und onkologisch kaum zu beherrschende Peritonealkarzinose hervorzurufen. Die Anheftung an ernährendes Peritoneum stellt dabei eine Grundvoraussetzung für die Ausbildung von Metastasen und möglicherweise einen therapeutisch nutzbaren Knotenpunkt dar. Gelingt es, die Adhäsionsfähigkeit entweder der Tumorzellen selbst und / oder des Peritoneums zu senken, ist eine verminderte Rezidivrate zu erwarten.

In unserer Arbeit haben wir das Wachstum von peritonealen Metastasen nach einer simulierten intraoperativen Tumoraussaat durch den Operateur in einem etablierten Tiermodell in Abhängigkeit von drei intraoperativ zu applizierenden, möglichen adhäsionsstörenden Substanzen quantifiziert. Zwei der untersuchten Substanzen - Intergel® und Interceed™ - wurden bzw. werden klinisch vor allen in der gynäkologischen Chirurgie erfolgreich zur Adhäsionsprophylaxe eingesetzt. Intergel® wurde im April 2003 aufgrund vermehrter postoperativer, lokaler Infektionen vom Markt genommen. Die dritte Substanz - Taurolidin / Heparin - ist bislang noch nicht als Adhäsionsinhibitor zur Verhinderung der Anheftung von Tumorzellen an das Peritoneum in der Tumorchirurgie bekannt, die

tumorsupprimierende Wirkung der intraperitonealen Anwendung wurde jedoch bereits in mehreren Untersuchungen nachgewiesen^{28,62-65,70,72,153,169-174}. Taurolidine wird in der abdominalen und gynäkologischen Chirurgie zur Verhinderung von adhäsiven Komplikationen eingesetzt^{73,106,175-180}.

Es wurde eine konventionelle Zökumresektion an sechzig BD-IX-Ratten durchgeführt und eine intraoperative Tumorzellaussaat durch intraperitoneale Applikation von 10.000 Zellen (DHD/K12/TRb) pro Tier simuliert. Der Eingriff wird unter Einhaltung allgemeiner tumorchirurgischer Richtlinien durchgeführt. Nach vier Wochen werden die Tiere getötet und obduziert, das makroskopische Tumorgewicht sowie die Lokalisation der Läsionen bestimmt und Proben zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung gewonnen.

Im zweiten Teil der Arbeit haben wir das Verhalten dreier ausgewählter Adhäsionsmoleküle, welchen in der Entstehung von Metastasen eine Schlüsselrolle zugeordnet wird, immunhistochemisch untersucht und die Expression semiquantitativ gemessen.

Intergel®

In der mit Intergel® behandelten Gruppe wurde keine statistisch signifikante, makroskopische Reduktion des Tumorwachstums nachgewiesen.

Ebensowenig liess sich ein Einfluss auf die Expression von CD44, β_1 -Integrin oder E-Cadherin zeigen. Als natürlicher Ligand von CD44 wäre am ehesten eine Alteration dieses Moleküls zu erwarten gewesen. Da die Substanz nicht mehr zugelassen ist, wird eine weitergehende experimentelle oder klinische Erforschung nicht mehr zu erwarten sein.

Interceed™

Es konnte keine statistisch signifikante, makroskopische Reduktion der Tumorgesamtmasse nachgewiesen werden.

Ein Einfluss auf die Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle besteht nicht. Interceed™ sorgt für eine mechanische Adhäsionsbarriere und hat vermutlich keinen weiterreichenden biochemischen Einfluss auf die Tumorzellen oder das Darmepithel. Als sicheres Prophylaktikum in der Tumorchirurgie ist das Produkt nicht anwendbar, da Tumorzellen überall in der Bauchhöhle dem Peritoneum anhaften können und eine lückenlose Auskleidung des viszeralen und parietalen Peritoneums nicht durchführbar ist.

Taurolidin / Heparin

Unsere Arbeit bestätigt die tumorsupprimierende Wirkung von intraperitoneal appliziertem Taurolidin / Heparin anhand einer statistisch signifikanten Reduktion der Metastasenanzahl und des Tumorgesamtgewichtes.

Die Expression von E-Cadherin auf dem Epithel der Metastasen wurde statistisch signifikant reduziert. Die Expression von CD44 und weniger deutlich auch β_1 -Integrin wird auf den Metastasen verringert, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die Zellen des gesunden Darmepithels werden nicht beeinflusst.

Eine tumorsupprimierende Wirkung von Taurolidin / Heparin ist in der vorliegenden Literatur unbestritten. Eine Vielzahl von Pathomechanismen dieser Wirkung wurden bereits nachgewiesen. In unserer Arbeit konnte zwar sowohl eine statistisch signifikante Reduktion der

Tumorgesamtmasse als auch eine Reduktion der immunhistochemisch nachweisbaren Adhäsionsmoleküle, vor allem E-Cadherin nachgewiesen werden, ein kausaler Zusammenhang beider Befunde bleibt jedoch fraglich. Generell wird eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen mit einer vermehrten Aggressivität von Tumoren assoziiert, was in unserem Experiment nicht nachvollzogen werden konnte. Die Frage, ob Taurolidin via Hemmung der Adhäsionsmoleküle die Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen herabsetzt und auf diesem Weg zur Reduktion des intraperitonealen Tumorwachstums beiträgt, wird von unserer Arbeit nicht beantwortet. Hierzu sind zukünftige molekularbiologische Untersuchungen erforderlich.

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
CD	cluster of differentiation
DAB	Diaminobenzidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
gas	growth arrest gene
IL	Interleukin
mRNA	messenger ribonucleic acid
p	statistische Überschreitungswahrscheinlichkeit
PAS	perjodic acid schiff
PBS	phosphate buffered saline
PDS	Polydioxanon
TBS	tris buffered saline
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	vascular epidermal growth factor
VLA	very late antigen

Literaturnachweis

1. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**, 74-108 (2005).
2. Jemal, A., *et al.* Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* **55**, 10-30 (2005).
3. Weir, H.K., *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1276-1299 (2003).
4. Troisi, R.J., Freedman, A.N. & Devesa, S.S. Incidence of colorectal carcinoma in the U.S.: an update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994. *Cancer* **85**, 1670-1676 (1999).
5. Jessup, J.M., McGinnis, L.S., Steele, G.D., Jr., Menck, H.R. & Winchester, D.P. The National Cancer Data Base. Report on colon cancer. *Cancer* **78**, 918-926 (1996).
6. Hieke, K., Kleeberg, U.R., Stauch, M. & Grothey, A. Costs of treatment of colorectal cancer in different settings in Germany. *Eur J Health Econ* **5**, 270-273 (2004).
7. Jehle, E.C. Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Analkarzinom. *Therapieempfehlungen*, 84 (2003).
8. Kerrigan, M., *et al.* Costs and survival of patients with colorectal cancer in a health maintenance organization and a preferred provider organization. *Med Care* **43**, 1043-1048 (2005).
9. Thorn, M., *et al.* Trends in colorectal cancer incidence in Sweden 1959-93 by gender, localization, time period, and birth cohort. *Cancer Causes Control* **9**, 145-152 (1998).

10. Cavallaro, U. & Christofori, G. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* **1014**, 58-66 (2004).
11. Liang, J.L., *et al.* [Multivariate regression analysis of recurrence following curative surgery for colorectal cancer]. *Ai Zheng* **23**, 564-567 (2004).
12. Desch, C.E., *et al.* Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *J Clin Oncol* **23**, 8512-8519 (2005).
13. Desch, C.E., *et al.* Recommended colorectal cancer surveillance guidelines by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* **17**, 1312 (1999).
14. Jacobi, C.A., *et al.* The influence of laparotomy and laparoscopy on tumor growth in a rat model. *Surg Endosc* **11**, 618-621 (1997).
15. Jacobi, C.A., *et al.* The impact of laparoscopy with carbon dioxide versus helium on immunologic function and tumor growth in a rat model. *Dig Surg* **15**, 110-116 (1998).
16. Kim, Z.G., Mehl, C., Lorenz, M. & Gutt, C.N. Impact of laparoscopic CO₂-insufflation on tumor-associated molecules in cultured colorectal cancer cells. *Surg Endosc* **16**, 1182-1186 (2002).
17. Lee, S.W., Gleason, N., Blanco, I., Asi, Z.K. & Whelan, R.L. Higher colon cancer tumor proliferative index and lower tumor cell death rate in mice undergoing laparotomy versus insufflation. *Surg Endosc* **16**, 36-39 (2002).
18. Ordemann, J., Hoflich, C., Braumann, C., Hartmann, J. & Jacobi, C.A. [Impact of pneumoperitoneum on expression of E-cadherin, CD44v6 and CD54 (ICAM-1) on HT-29 colon-carcinoma cells]. *Zentralbl Chir* **130**, 405-409 (2005).

19. Schaeff, B., Paolucci, V. & Thomopoulos, J. Port site recurrences after laparoscopic surgery. A review. *Dig Surg* **15**, 124-134 (1998).
20. Southall, J.C., Lee, S.W., Allendorf, J.D., Bessler, M. & Whelan, R.L. Colon adenocarcinoma and B-16 melanoma grow larger following laparotomy vs. pneumoperitoneum in a murine model. *Dis Colon Rectum* **41**, 564-569 (1998).
21. Takiguchi, S., *et al.* Influence of CO₂ pneumoperitoneum during laparoscopic surgery on cancer cell growth. *Surg Endosc* **14**, 41-44 (2000).
22. Tomita, H., Marcello, P.W., Milsom, J.W., Gramlich, T.L. & Fazio, V.W. CO₂ pneumoperitoneum does not enhance tumor growth and metastasis: study of a rat cecal wall inoculation model. *Dis Colon Rectum* **44**, 1297-1301 (2001).
23. Whelan, R.L. & Lee, S.W. Review of investigations regarding the etiology of port site tumor recurrence. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* **9**, 1-16 (1999).
24. Zayyan, K.S., *et al.* Rapid flow carbon dioxide laparoscopy disperses cancer cells into the peritoneal cavity but not the port sites in a new rat model. *Surg Endosc* **17**, 273-277 (2003).
25. Johns, D.B., Keyport, G.M., Hoehler, F. & diZerega, G.S. Reduction of postsurgical adhesions with Intergel adhesion prevention solution: a multicenter study of safety and efficacy after conservative gynecologic surgery. *Fertil Steril* **76**, 595-604 (2001).
26. Eroglu, A., Demirci, S., Kurtman, C., Akbay, A. & Eroglu, N. Prevention of intra-abdominal adhesions by using Seprafilm in rats undergoing bowel resection and radiation therapy. *Colorectal Dis* **3**, 33-37 (2001).
27. Hubbard, S.C. & Burns, J.W. Effects of a hyaluronan-based membrane (Seprafilm) on intraperitoneally disseminated human colon

cancer cell growth in a nude mouse model. *Dis Colon Rectum* **45**, 334-341; discussion 341-334 (2002).

28. Opitz, I., *et al.* The influence of adhesion prophylactic substances and taurolidine/heparin on local recurrence and intraperitoneal tumor growth after laparoscopic-assisted bowel resection of colon carcinoma in a rat model. *Surg Endosc* **17**, 1098-1104 (2003).

29. Pelosi, M.A., 2nd & Pelosi, M.A., 3rd. A new nonabsorbable adhesion barrier for myomectomy. *Am J Surg* **184**, 428-432 (2002).

30. Sikkink, C.J., *et al.* Hyaluronan-based antiadhesive membrane has no major effect on intraperitoneal growth of colonic tumour cells. *Eur Surg Res* **36**, 123-128 (2004).

31. Ziprin, P., Ridgway, P.F., Peck, D.H. & Darzi, A.W. Laparoscopic enhancement of tumour cell binding to the peritoneum is inhibited by anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody. *Surg Endosc* **17**, 1812-1817 (2003).

32. Beliard, A., Noel, A., Goffin, F., Frankenne, F. & Foidart, J.M. Adhesion of endometrial cells labeled with ¹¹¹Indium-tropolonate to peritoneum: a novel in vitro model to study endometriosis. *Fertil Steril* **79 Suppl 1**, 724-729 (2003).

33. Occelli, B., *et al.* [Postoperative adhesions following para-aortic lymphadenectomy by laparotomy with as compared to without Intergel. Experimental animal study]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **33**, 110-118 (2004).

34. Al-Jaroudi, D. & Tulandi, T. Adhesion prevention in gynecologic surgery. *Obstet Gynecol Surv* **59**, 360-367 (2004).

35. Johns, A. Evidence-based prevention of post-operative adhesions. *Hum Reprod Update* **7**, 577-579 (2001).

36. Brundell, S. & Hewett, P. Can adhesions be prevented? *Aust N Z J Surg* **70**, 900-901 (2000).
37. Farquhar, C., Vandekerckhove, P., Watson, A., Vail, A. & Wiseman, D. Barrier agents for preventing adhesions after surgery for subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000475 (2000).
38. Wallwiener, D., Meyer, A. & Bastert, G. Adhesion formation of the parietal and visceral peritoneum: an explanation for the controversy on the use of autologous and alloplastic barriers? *Fertil Steril* **69**, 132-137 (1998).
39. DeCherney, A.H. & diZerega, G.S. Clinical problem of intraperitoneal postsurgical adhesion formation following general surgery and the use of adhesion prevention barriers. *Surg Clin North Am* **77**, 671-688 (1997).
40. Watkins, F.H., *et al.* Peritoneal healing with adhesion formation: current comment. *J Long Term Eff Med Implants* **7**, 139-154 (1997).
41. diZerega, G.S. Use of adhesion prevention barriers in ovarian surgery, tubalplasty, ectopic pregnancy, endometriosis, adhesiolysis, and myomectomy. *Curr Opin Obstet Gynecol* **8**, 230-237 (1996).
42. Saravelos, H.G. & Li, T.C. Physical barriers in adhesion prevention. *J Reprod Med* **41**, 42-51 (1996).
43. Larsson, B. Efficacy of Interceed in adhesion prevention in gynecologic surgery: a review of 13 clinical studies. *J Reprod Med* **41**, 27-34 (1996).
44. diZerega, G.S. Contemporary adhesion prevention. *Fertil Steril* **61**, 219-235 (1994).
45. Greenblatt, E. Surgical options in polycystic ovary syndrome patients who do not respond to medical ovulation induction. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* **7**, 421-433 (1993).
46. Stone, K. Adhesions in gynecologic surgery. *Curr Opin Obstet Gynecol* **5**, 322-327 (1993).

47. Daniell, J.F. & Kurtz, B.R. Techniques in laparoscopy that reduce postsurgical adhesions. *Prog Clin Biol Res* **381**, 59-63 (1993).
48. diZerega, G.S. The cause and prevention of postsurgical adhesions: a contemporary update. *Prog Clin Biol Res* **381**, 1-18 (1993).
49. Hershlag, A., Diamond, M.P. & DeCherney, A.H. Adhesiolysis. *Clin Obstet Gynecol* **34**, 395-402 (1991).
50. Seifer, D.B., Diamond, M.P. & DeCherney, A.H. An appraisal of barrier agents in the reduction of adhesion formation following surgery. *J Gynecol Surg* **6**, 3-10 (1990).
51. Hart, H., Seifert, J. & Brendel, W. [Effects and side effects of taurolin in experimental peritonitis in the rat]. *Langenbecks Arch Chir* **368**, 149-162 (1986).
52. Konukoglu, D., Iynem, H. & Ziylan, E. Antioxidant status in experimental peritonitis: effects of alpha tocopherol and taurolin. *Pharmacol Res* **39**, 247-251 (1999).
53. Popovic, M., *et al.* [Use of taurolin in the prevention of septic complications in emergency abdominal surgery]. *Acta Chir Iugosl* **38**, 23-33 (1991).
54. Reith, H.B. [Therapy of peritonitis today. Surgical management and adjuvant therapy strategies]. *Langenbecks Arch Chir* **382**, S14-17 (1997).
55. Rosman, C., Westerveld, G.J., Kooi, K. & Bleichrodt, R.P. Local treatment of generalised peritonitis in rats; effects on bacteria, endotoxin and mortality. *Eur J Surg* **165**, 1072-1079 (1999).
56. Rosman, C., Westerveld, G.J., van Oeveren, W., Kooi, K. & Bleichrodt, R.P. Effect of intraperitoneal antimicrobials on the concentration of bacteria, endotoxin, and tumor necrosis factor in abdominal fluid and plasma in rats. *Eur Surg Res* **28**, 351-360 (1996).

57. Schneider, A., Sack, U., Rothe, K. & Bennek, J. Peritoneal taurolidine lavage in children with localised peritonitis due to appendicitis. *Pediatr Surg Int* **21**, 445-448 (2005).
58. Sendt, W., Mansouri, E., Schmitt-Graeff, A., Wolff-Vorbeck, G. & Schoffel, U. Influence of antiseptic agents on interleukin-8 release and transmigration of polymorphonuclear neutrophils in a human in vitro model of peritonitis. *Surg Infect (Larchmt)* **3**, 235-244 (2002).
59. Staubach, K.H. [Adjuvant therapy of peritonitis with taurolidine. Modulation of mediator liberation]. *Langenbecks Arch Chir* **382**, S26-30 (1997).
60. Woltmann, A., Schult, M., Schiedeck, T., Markert, U. & Bruch, H.P. [Peritoneal lavage in standardized peritonitis models]. *Zentralbl Chir* **124**, 195-198 (1999).
61. Calabresi, P., Goulette, F.A. & Darnowski, J.W. Taurolidine - Cytotoxic and Mechanistic Evaluation of a Novel Antineoplastic Agent. (2001).
62. Braumann, C., Schoenbeck, M., Menenakos, C., Kilian, M. & Jacobi, C.A. Effects of increasing doses of a bolus injection and an intravenous long-term therapy of taurolidine on subcutaneous (metastatic) tumor growth in rats. *Clin Exp Metastasis* **22**, 77-83 (2005).
63. Jacobi, C.A., Menenakos, C. & Braumann, C. Taurolidine--a new drug with anti-tumor and anti-angiogenic effects. *Anticancer Drugs* **16**, 917-921 (2005).
64. Jacobi, C.A., Peter, F.J., Wenger, F.A., Ordemann, J. & Muller, J.M. New therapeutic strategies to avoid intra- and extraperitoneal metastases during laparoscopy: results of a tumor model in the rat. *Dig Surg* **16**, 393-399 (1999).

65. Jacobi, C.A., *et al.* [Peritoneal instillation of taurolidine and heparin for preventing intraperitoneal tumor growth and trocar metastases in laparoscopic operations in the rat model]. *Langenbecks Arch Chir* **382**, S31-36 (1997).
66. Jacobi, C.A., Wildbrett, P., Volk, T. & Muller, J.M. Influence of different gases and intraperitoneal instillation of antiadherent or cytotoxic agents on peritoneal tumor cell growth and implantation with laparoscopic surgery in a rat model. *Surg Endosc* **13**, 1021-1025 (1999).
67. Braumann, C., Henke, W., Jacobi, C.A. & Dubiel, W. The tumor-suppressive reagent taurolidine is an inhibitor of protein biosynthesis. *Int J Cancer* **112**, 225-230 (2004).
68. Braumann, C., Ordemann, J., Kilian, M., Wenger, F.A. & Jacobi, C.A. Local and systemic chemotherapy with taurolidine and taurolidine/heparin in colon cancer-bearing rats undergoing laparotomy. *Clin Exp Metastasis* **20**, 387-394 (2003).
69. Braumann, C., Ordemann, J., Wildbrett, P. & Jacobi, C.A. Influence of intraperitoneal and systemic application of taurolidine and taurolidine/heparin during laparoscopy on intraperitoneal and subcutaneous tumour growth in rats. *Clin Exp Metastasis* **18**, 547-552 (2000).
70. Kilian, M., *et al.* Effects of taurolidine and octreotide on tumor growth and lipid peroxidation after staging-laparoscopy in ductal pancreatic cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69**, 261-267 (2003).
71. Bedrosian, I., Sofia, R.D., Wolff, S.M. & Dinarello, C.A. Taurolidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* **3**, 568-575 (1991).

72. McCourt, M., Wang, J.H., Sookhai, S. & Redmond, H.P. Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo. *Ann Surg Oncol* **7**, 685-691 (2000).
73. Blenkarn, J.I. Sustained anti-adherence activity of taurolidine (Taurolin) and noxythiolin (Noxyflex S) solutions. *J Pharm Pharmacol* **40**, 509-511 (1988).
74. Goldstein, D.S., *et al.* Inhibition of peritoneal tumor-cell implantation: model for laparoscopic cancer surgery. *J Endourol* **7**, 237-241 (1993).
75. Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P.A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 33-45 (2003).
76. Marhaba, R. & Zoller, M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol* **35**, 211-231 (2004).
77. Nair, K.S., Naidoo, R. & Chetty, R. Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value. *J Clin Pathol* **58**, 343-351 (2005).
78. Makrydimas, G., Zagorianakou, N., Zagorianakou, P. & Agnantis, N.J. CD44 family and gynaecological cancer. *In Vivo* **17**, 633-640 (2003).
79. Jayne, D.G. The molecular biology of peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer. *Ann Acad Med Singapore* **32**, 219-225 (2003).
80. Jothy, S. CD44 and its partners in metastasis. *Clin Exp Metastasis* **20**, 195-201 (2003).
81. Martin, T.A., Harrison, G., Mansel, R.E. & Jiang, W.G. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol* **46**, 165-186 (2003).
82. Matsuura, N., Waki, H., Tsukiyama, A. & Tsujimoto, M. [The role of CD44 in the invasion and metastasis of gastric cancer]. *Nippon Rinsho* **59 Suppl 4**, 101-106 (2001).

83. Sneath, R.J. & Mangham, D.C. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* **51**, 191-200 (1998).
84. Yamaguchi, A. [Expression of variant CD44 in colorectal cancer and its relationship to liver metastasis]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* **99**, 409-414 (1998).
85. Rudzki, Z. & Jothy, S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol* **50**, 57-71 (1997).
86. Terpe, H.J. & Bocker, W. [Significance of adhesion molecules in oncology]. *Pathologe* **18**, 117-123 (1997).
87. Price, J.T., Bonovich, M.T. & Kohn, E.C. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **32**, 175-253 (1997).
88. Naor, D., Sionov, R.V. & Ish-Shalom, D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* **71**, 241-319 (1997).
89. Streit, M., Schmidt, R., Hilgenfeld, R.U., Thiel, E. & Kreuser, E.D. Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. *J Mol Med* **74**, 253-268 (1996).
90. Sy, M.S., *et al.* Interactions between CD44 and hyaluronic acid: their role in tumor growth and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* **213 (Pt 3)**, 129-153 (1996).
91. Subramaniam, V., Vincent, I.R. & Jothy, S. Upregulation and dephosphorylation of cofilin: Modulation by CD44 variant isoform in human colon cancer cells. *Exp Mol Pathol* **79**, 187-193 (2005).
92. Bendardaf, R., *et al.* E-cadherin, CD44s and CD44v6 correlate with tumour differentiation in colorectal cancer. *Oncol Rep* **13**, 831-835 (2005).
93. Balaram, P., Alex, S., Panikkar, B. & Rajalekshmi, T.N. Adhesion-related proteins E-cadherin, P-cadherin, CD44, and CD44v6, and

antimetastatic protein nm23H1 in complete hydatidiform moles in relation to invasion potential. *Int J Gynecol Cancer* **14**, 532-539 (2004).

94. Fjeldstad, K. & Kolset, S.O. Decreasing the metastatic potential in cancers--targeting the heparan sulfate proteoglycans. *Curr Drug Targets* **6**, 665-682 (2005).

95. Hirohashi, K., *et al.* CD44 and VEGF expression in extrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* **51**, 1121-1123 (2004).

96. Qin, L.X. & Tang, Z.Y. Recent progress in predictive biomarkers for metastatic recurrence of human hepatocellular carcinoma: a review of the literature. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**, 497-513 (2004).

97. Hirabayashi, Y., *et al.* Port-site metastasis after CO₂ pneumoperitoneum: role of adhesion molecules and prevention with antiadhesion molecules. *Surg Endosc* **18**, 1113-1117 (2004).

98. Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25 (1992).

99. Vihinen, P., *et al.* Prognostic value of beta1 integrin expression in metastatic melanoma. *Melanoma Res* **10**, 243-251 (2000).

100. Bottger, T.C., *et al.* Prognostic value of immunohistochemical expression of beta-1 integrin in pancreatic carcinoma. *Oncology* **56**, 308-313 (1999).

101. Hieken, T.J., Ronan, S.G., Farolan, M., Shilkaitis, A.L. & Das Gupta, T.K. Molecular prognostic markers in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer* **85**, 375-382 (1999).

102. Troyanovsky, S. Cadherin dimers in cell-cell adhesion. *Eur J Cell Biol* **84**, 225-233 (2005).

103. Patel, S.D., Chen, C.P., Bahna, F., Honig, B. & Shapiro, L. Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 690-698 (2003).
104. Denk, H. *Pathologie*, (Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1999).
105. Werner, M., Chott, A., Fabiano, A. & Battifora, H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* **24**, 1016-1019 (2000).
106. Opitz, I., *et al.* Instillation of taurolidine/heparin after laparotomy reduces intraperitoneal tumour growth in a colon cancer rat model. *Eur Surg Res* **39**, 129-135 (2007).
107. Matsui, Y., *et al.* Hyaluronic acid stimulates tumor-cell proliferation at wound sites. *Gastrointest Endosc* **60**, 539-543 (2004).
108. Sohn, D.K., *et al.* Does hyaluronic acid stimulate tumor growth after endoscopic mucosal resection? *J Gastroenterol Hepatol* **23**, 1204-1207 (2008).
109. Dahl, S.C. & Grabel, L.B. Integrin phosphorylation is modulated during the differentiation of F-9 teratocarcinoma stem cells. *J Cell Biol* **108**, 183-190 (1989).
110. Adams, J.C. & Watt, F.M. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. *Cell* **63**, 425-435 (1990).
111. Neugebauer, K.M. & Reichardt, L.F. Cell-surface regulation of beta 1-integrin activity on developing retinal neurons. *Nature* **350**, 68-71 (1991).
112. Tang, C.L., *et al.* A randomized controlled trial of 0.5% ferric hyaluronate gel (Intergel) in the prevention of adhesions following abdominal surgery. *Ann Surg* **243**, 449-455 (2006).

113. Xu, Y. & Yu, Q. E-cadherin negatively regulates CD44-hyaluronan interaction and CD44-mediated tumor invasion and branching morphogenesis. *J Biol Chem* **278**, 8661-8668 (2003).
114. Lanfrancone, L., *et al.* Human peritoneal mesothelial cells produce many cytokines (granulocyte colony-stimulating factor [CSF], granulocyte-monocyte-CSF, macrophage-CSF, interleukin-1 [IL-1], and IL-6) and are activated and stimulated to grow by IL-1. *Blood* **80**, 2835-2842 (1992).
115. Badia, J.M., *et al.* Peritoneal and systemic cytokine response to laparotomy. *Br J Surg* **83**, 347-348 (1996).
116. Tsukada, K., *et al.* Concentrations of cytokines in peritoneal fluid after abdominal surgery. *Eur J Surg* **159**, 475-479 (1993).
117. Nici, L., Monfils, B. & Calabresi, P. The effects of taurolidine, a novel antineoplastic agent, on human malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res* **10**, 7655-7661 (2004).
118. Darnowski, J.W., Goulette, F.A., Cousens, L.P., Chatterjee, D. & Calabresi, P. Mechanistic and antineoplastic evaluation of taurolidine in the DU145 model of human prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **54**, 249-258 (2004).
119. Shroyer, D.P., Lukoff, H., King, T. & Calabresi, P. The effect of Taurolidine on adherent and floating subpopulations of melanoma cells. *Anticancer Drugs* **14**, 295-303 (2003).
120. Han, Z., *et al.* The antibacterial drug taurolidine induces apoptosis by a mitochondrial cytochrome c-dependent mechanism. *Anticancer Res* **22**, 1959-1964 (2002).
121. Calabresi, P., Goulette, F.A. & Darnowski, J.W. Taurolidine: cytotoxic and mechanistic evaluation of a novel antineoplastic agent. *Cancer Res* **61**, 6816-6821 (2001).

122. Walters, D.K., *et al.* Taurolidine: a novel anti-neoplastic agent induces apoptosis of osteosarcoma cell lines. *Invest New Drugs* **25**, 305-312 (2007).
123. Stendel, R., Scheurer, L., Stoltenburg-Didinger, G., Brock, M. & Mohler, H. Enhancement of Fas-ligand-mediated programmed cell death by taurolidine. *Anticancer Res* **23**, 2309-2314 (2003).
124. Gorman, S.P., McCafferty, D.F., Woolfson, A.D. & Jones, D.S. A comparative study of the microbial antiadherence capacities of three antimicrobial agents. *J Clin Pharm Ther* **12**, 393-399 (1987).
125. Gorman, S.P., McCafferty, D.F., Woolfson, A.D. & Jones, D.S. Reduced adherence of micro-organisms to human mucosal epithelial cells following treatment with Taurolin, a novel antimicrobial agent. *J Appl Bacteriol* **62**, 315-320 (1987).
126. Jones, D.S., Gorman, S.P., McCafferty, D.F. & Woolfson, A.D. The effects of three non-antibiotic, antimicrobial agents on the surface hydrophobicity of certain micro-organisms evaluated by different methods. *J Appl Bacteriol* **71**, 218-227 (1991).
127. Kuhn, S., *et al.* A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* **5**, 553-567 (2007).
128. Delektorskaia, V.V., Perevoshchikov, A.G., Golovkov, D.A. & Kushlinskii, N.E. [Immunohistochemical study of E-cadherin, beta-catenin and CD-44v6 expression in the cells of primary colon cancer and its metastases]. *Arkh Patol* **67**, 34-38 (2005).
129. Visca, P., *et al.* Role and prognostic significance of CD44s expression in colorectal cancer. *Anticancer Res* **22**, 2671-2675 (2002).
130. Coppola, D., *et al.* CD44V6 expression in human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* **29**, 627-635 (1998).

131. Yamaguchi, A., *et al.* Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* **14**, 1122-1127 (1996).
132. Streit, M., Schmidt, R., Hilgenfeld, R.U., Thiel, E. & Kreuser, E.D. Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. *Recent Results Cancer Res* **142**, 19-50 (1996).
133. Nihei, Z., *et al.* The positive relationship between the expression of CD44 variant 6 and prognosis in colorectal cancer. *Surg Today* **26**, 760-761 (1996).
134. Finke, L.H., Zorb, C., Haensch, W., Schlag, P.M. & Terpe, H.J. [Expression of CD44 isoforms--a new histopathologic parameter in colorectal carcinoma?]. *Zentralbl Chir* **121**, 450-454 (1996).
135. Herrlich, P., Pals, S. & Ponta, H. CD44 in colon cancer. *Eur J Cancer* **31A**, 1110-1112 (1995).
136. Sleeman, J., *et al.* The role of CD44 splice variants in human metastatic cancer. *Ciba Found Symp* **189**, 142-151; discussion 151-146, 174-146 (1995).
137. Gunthert, U., *et al.* Are CD44 variant isoforms involved in human tumour progression? *Cancer Surv* **24**, 19-42 (1995).
138. Finn, L., *et al.* Alternative splicing of CD44 pre-mRNA in human colorectal tumors. *Biochem Biophys Res Commun* **200**, 1015-1022 (1994).
139. Ngan, C.Y., *et al.* A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer. *J Surg Oncol* **95**, 652-662 (2007).
140. Gee, K., *et al.* Differential regulation of CD44 expression by lipopolysaccharide (LPS) and TNF-alpha in human monocytic cells: distinct involvement of c-Jun N-terminal kinase in LPS-induced CD44 expression. *J Immunol* **169**, 5660-5672 (2002).

141. Delcommenne, M., Kannagi, R. & Johnson, P. TNF-alpha increases the carbohydrate sulfation of CD44: induction of 6-sulfo N-acetyl lactosamine on N- and O-linked glycans. *Glycobiology* **12**, 613-622 (2002).
142. Kulseth, M.A., Kolset, S.O. & Ranheim, T. Stimulation of serglycin and CD44 mRNA expression in endothelial cells exposed to TNF-alpha and IL-1alpha. *Biochim Biophys Acta* **1428**, 225-232 (1999).
143. Barshishat, M., *et al.* TNFalpha and IL-8 regulate the expression and function of CD44 variant proteins in human colon carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* **19**, 327-337 (2002).
144. Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K. & Juliano, R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* **50**, 197-263 (1998).
145. Howe, A., Aplin, A.E., Alahari, S.K. & Juliano, R.L. Integrin signaling and cell growth control. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 220-231 (1998).
146. Agrez, M.V. & Bates, R.C. Colorectal cancer and the integrin family of cell adhesion receptors: current status and future directions. *Eur J Cancer* **30A**, 2166-2170 (1994).
147. Benlimame, N., *et al.* FAK signaling is critical for ErbB-2/ErbB-3 receptor cooperation for oncogenic transformation and invasion. *J Cell Biol* **171**, 505-516 (2005).
148. Kim, W.H., Jun, S.H., Kibbey, M.C., Thompson, E.W. & Kleinman, H.K. Expression of beta 1 integrin in laminin-adhesion-selected human colon cancer cell lines of varying tumorigenicity. *Invasion Metastasis* **14**, 147-155 (1994).
149. Gong, J., *et al.* Role of alpha 5 beta 1 integrin in determining malignant properties of colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ* **8**, 83-90 (1997).

150. Chan, B.M., Matsuura, N., Takada, Y., Zetter, B.R. & Hemler, M.E. In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* **251**, 1600-1602 (1991).
151. Varner, J.A., Emerson, D.A. & Juliano, R.L. Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* **6**, 725-740 (1995).
152. Zetter, B.R. Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* **4**, 219-229 (1993).
153. Jacobi, C.A., *et al.* Inhibition of peritoneal tumor cell growth and implantation in laparoscopic surgery in a rat model. *Am J Surg* **174**, 359-363 (1997).
154. Maruyama, K., Ochiai, A., Nakamura, S., Baba, S. & Hirohashi, S. [Dysfunction of E-cadherin-catenin system in invasion and metastasis of colorectal cancer]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* **99**, 402-408 (1998).
155. Birchmeier, W., Weidner, K.M., Hulsken, J. & Behrens, J. Molecular mechanisms leading to cell junction (cadherin) deficiency in invasive carcinomas. *Semin Cancer Biol* **4**, 231-239 (1993).
156. Birchmeier, W. E-cadherin as a tumor (invasion) suppressor gene. *Bioessays* **17**, 97-99 (1995).
157. Birchmeier, W., Hulsken, J. & Behrens, J. E-cadherin as an invasion suppressor. *Ciba Found Symp* **189**, 124-136; discussion 136-141, 174-126 (1995).
158. Birchmeier, C., Meyer, D. & Riethmacher, D. Factors controlling growth, motility, and morphogenesis of normal and malignant epithelial cells. *Int Rev Cytol* **160**, 221-266 (1995).
159. Birchmeier, W., Hulsken, J. & Behrens, J. Adherens junction proteins in tumour progression. *Cancer Surv* **24**, 129-140 (1995).

160. Kinsella, A.R., Lepts, G.C., Hill, C.L. & Jones, M. Reduced E-cadherin expression correlates with increased invasiveness in colorectal carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* **12**, 335-342 (1994).
161. Dorudi, S., Sheffield, J.P., Poulsom, R., Northover, J.M. & Hart, I.R. E-cadherin expression in colorectal cancer. An immunocytochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* **142**, 981-986 (1993).
162. Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N. & Pignatelli, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* **87**, 992-1005 (2000).
163. Kinsella, A.R., *et al.* The role of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in large bowel tumour cell invasion and metastasis. *Br J Cancer* **67**, 904-909 (1993).
164. Nigam, A.K., *et al.* Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Br J Cancer* **68**, 507-514 (1993).
165. Keller, S.H. & Nigam, S.K. Biochemical processing of E-cadherin under cellular stress. *Biochem Biophys Res Commun* **307**, 215-223 (2003).
166. Steinhilber U, W.J., Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 4972-4980 (2001).
167. Zhu, W., Leber, B. & Andrews, D.W. Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *Embo J* **20**, 5999-6007 (2001).
168. Christofori, G. & Semb, H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* **24**, 73-76 (1999).
169. Braumann, C., Tangermann, J., Jacobi, C.A., Muller, J.M. & Dubiel, W. Novel anti-angiogenic compounds for application in tumor therapy -

COP9 signalosome-associated kinases as possible targets. *Mini Rev Med Chem* **8**, 421-428 (2008).

170. Braumann, C., *et al.* The tumor suppressive reagent taurolidine inhibits growth of malignant melanoma--a mouse model. *J Surg Res* **143**, 372-378 (2007).

171. Braumann, C., *et al.* High doses of taurolidine inhibit advanced intraperitoneal tumor growth in rats. *J Surg Res* **129**, 129-135 (2005).

172. Stendel, R., Stoltenburg-Didinger, G., Al Keikh, C.L., Wattrodt, M. & Brock, M. The effect of taurolidine on brain tumor cells. *Anticancer Res* **22**, 809-814 (2002).

173. Da Costa, M.L., Redmond, H.P. & Bouchier-Hayes, D.J. Taurolidine improves survival by abrogating the accelerated development and proliferation of solid tumors and development of organ metastases from circulating tumor cells released following surgery. *J Surg Res* **101**, 111-119 (2001).

174. Volz, J., *et al.* Modulation of tumor-induced lethality after pneumoperitoneum in a mouse model. *Cancer* **89**, 262-266 (2000).

175. Tarhan, O.R., Barut, I. & Sezik, M. An evaluation of normal saline and taurolidine on intra-abdominal adhesion formation and peritoneal fibrinolysis. *J Surg Res* **144**, 151-157 (2008).

176. Kaptanoglu, L., *et al.* The effect of taurolidine on experimental thrombus formation. *Eur J Pharmacol* **578**, 238-241 (2008).

177. Bahadir, I., Oncel, M., Kement, M. & Sahip, Y. Intra-abdominal use of taurolidine or heparin as alternative products to an antiadhesive barrier (Seprafilm) in adhesion prevention: an experimental study on mice. *Dis Colon Rectum* **50**, 2209-2214 (2007).

178. Bobrich, E., *et al.* Influence of intraperitoneal application of taurolidine/heparin on expression of adhesion molecules and colon cancer in rats undergoing laparoscopy. *J Surg Res* **137**, 75-82 (2007).
179. Erpek, H., Tuncyurek, P., Soyder, A. & Boylu, S. Hyaluronic acid/carboxymethylcellulose membrane barrier versus taurolidine for the prevention of adhesions to polypropylene mesh. *Eur Surg Res* **38**, 414-417 (2006).
180. Blenkarn, J.I. Anti-adherence properties of taurolidine and noxythiolin. *J Chemother* **1**, 233-234 (1989).

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird mein Lebenslauf in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsverzeichnis

Opitz, I.; van der Veen, H; Witte, N et al.

Instillation of taurolidine/heparin after laparotomy reduces intraperitoneal tumour growth in a colon cancer rat model.

Eur Surg Res 39, 129-135 (2007).

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Nils Witte, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss der intraoperativen Applikation von Taurolin / Heparin, Intergel und Interceed auf das lokale und peritoneale Tumorwachstum sowie die Expression der Adhäsionsmoleküle CD44, Beta-1-Integrin und E-Cadherin bei offen-chirurgischer Intervention in einem Kolonkarzinommodell bei Ratten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 01.03.2010

Nils Witte