

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Materialienliste

Bezeichnung	Firma	Ort
<b><u>Chemikalien:</u></b>		
Agarose	Sigma	Taufkirchen
Chloroform	Sigma	Taufkirchen
DEPC	Sigma	Taufkirchen
DTT	Sigma	Taufkirchen
EDTA	Sigma	Taufkirchen
Ethanol	Baker	Deventer/Niederlande
Hämalaun	VWR	Darmstadt
Jodlösung	B.Braun	Melsungen
Natriumazetat	Sigma	Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma	Taufkirchen
Trizol	Invitrogen	Karlsruhe
Trypanblau	Merck	Darmstadt
Trypsin (Viralex Trypsin / EDTA)	PAA Laboratories	Pasching
<b><u>Enzym:</u></b>		
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega	Mannheim
<b><u>Pharmaka:</u></b>		
Embutramid (T61 <sup>®</sup> )	Intervet	Wiesbaden
Finadyne <sup>®</sup>	Essex Teirarznei	München
Forene <sup>®</sup>	Abbott	Wiesbaden
Ketanest <sup>®</sup>	Parke-Davis	Karlsruhe
Rompun <sup>®</sup> (2 %)	Bayer AG	Leverkusen
<b><u>Zellkulturmedium:</u></b>		
Fötales Kälberserum	Seromed	Berlin
<b><u>Zelllinien:</u></b>		
CC 531-Tumorzellen	Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums	Heidelberg

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Ort</b>
<b><u>MMP-Inhibitor:</u></b>		
Aktinonin (5 mg)	Sigma	Taufkirchen
<b><u>RT-PCR:</u></b>		
dNTP's	Sigma	Taufkirchen
OligodT (40 µM)	Promega	Mannheim
Primer	TIB Molbiol	Berlin
RNAsin	Promega	Mannheim
Ready-Taq-Mix	Sigma	Taufkirchen
<b><u>Invasionsassay:</u></b>		
BSA	Sigma	Taufkirchen
Matrigel	BD	Bedford
Phosphatpuffer (PBS)	Seromed	Berlin
<b><u>Plastikware:</u></b>		
Einmalspritzen (1, 10 ml)	Becton Dickinson	Heidelberg
Einweg-Pipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt	Nümbrecht
Eppendorf-Tubes	Eppendorf	Hamburg
Handschuhe (Latex)	VWR	Darmstadt
Transwell-Platten	Costar	New York, USA
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt	Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Sarstedt	Nümbrecht
<b><u>Geräte:</u></b>		
Schermaschine	Hauptner & Herberholz	Solingen
UV-Transluminator UVT-28 M	Herolab	Wiesloch
<b><u>Verschiedenes:</u></b>		
Aquamount	VWR	Darmstadt
Dexon II	B.Braun	Melsungen
Histoacrylkleber <sup>®</sup>	B.Braun	Melsungen
Pen/Strep (1 %)	Seromed	Berlin
Q-Tip	TZMO	Bernau
Scalpel	PFM	Köln
Vicryl 5/0	Ethicon	Norderstedt

### **4.1.2 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche WAG-Ratten aus der Zucht der Zentralen Tierlaboratorien (ZTL) der Freien Universität Berlin mit einem initialen Körpergewicht von 200-280 g und einem entsprechenden Lebensalter von vier bis sechs Monaten. Ihre Ernährung erfolgte mit Altromin® (Standard-Diät-Haltung für Ratten) und Wasser ad libitum aus der automatischen Tränkanlage.

Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20 °C ( $\pm 2$  °C), einer relativen Luftfeuchte von 55 % ( $\pm 5$  %) und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

WAG-Ratten sind für diese Untersuchung besonders geeignet, da die Kolonkarzinomzellen CC 531 aus WAG-Ratten stammen und sollten für ein Tiermodell in die gleichen syngenen Tiere implantiert werden. Darüber hinaus bestehen bezüglich Durchführung operativer Eingriffe bei der verwendeten Tierspezies in der Arbeitsgruppe bereits weitreichende Erfahrungen. Die Tierversuchsgenehmigungsnummer lautet G0037/97.

### **4.1.3 Anatomie der Rattenleber**

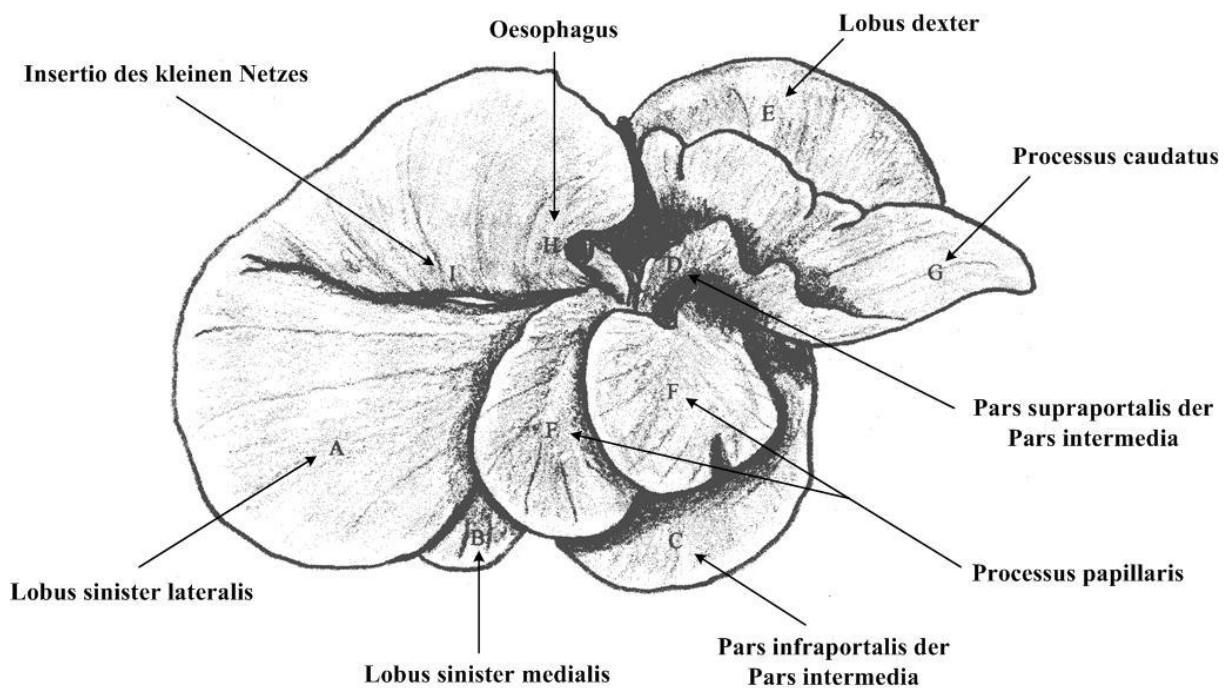
Der grösste Anteil der Leber liegt innerhalb der rippengestützten Bauchhöhle, lediglich ventral erstrecken sich die Leberländer über den Rippenbogen hinaus. Im Bereich des Zwerchfells (Diaphragma) ist die Oberfläche stark konvex gekrümmt.

Die Visceralfläche (Facies visceralis) berührt den Magen, Teile des Duodenum und des Colon, das Jejunum sowie die Milz.

Die Leber ist in einen linken, mittleren und rechten Leberlappen (Lobi) gegliedert: Der linke Leberlappen (Lobus sinister) besteht aus einem grossen lateralen Anteil (Lobus sinister lateralis), der lediglich durch interstitielles Gewebe und Gefässe mit den anderen Leberlappen verbunden ist, und einem kleineren weiter kranial gelegenen medialen Anteil (Lobus sinister medialis). Die Pars intermedia wird in einen kranial gelegenen supraportalen Teil (Pars supraportalis) und einen infraportalen Teil (Pars infraportalis) unterteilt. Der rechte Leberlappen (Lobus dexter) wird nicht weiter unterteilt. Er berührt die rechte Niere. Der spitze Processus caudatus ragt aus der visceralen Oberfläche nach dorsal und zur rechten Seite. Seine dorsale Oberfläche (Impressio renalis) grenzt an die ventrale Seite der rechten Niere. Zwei flache Processus papillare entspringen ebenfalls der Facies visceralis. Der dorsal gelegene Processus zieht entlang der rechten Seite der Speiseröhre (Oesophagus) über die kleine Krümmung (Curvatura ventriculi minor) zum Kaudalrand des Magens. Der ventrale Processus papillaris erreicht den kranialen Magenrand.

Die Bänder der Leber sind sehr fein ausgeprägt. Das kleine Netz (Omentum minus) zieht von der kleinen Krümmung des Magens kaudal zur Visceralfläche der Leber und wird entlang einer schräg verlaufenden Linie über den Lobus sinister lateralis und zwischen den beiden Processus papillares an der Leberpforte befestigt. Die Insertio des Ligamentum falciforme, welches die Leber an der ventralen Bauchwand und dem Diaphragma befestigt, erfolgt im Einschnitt zwischen dem Lobus sinister lateralis und dem Lobus sinister medialis. In seinem Verlauf trifft es auf das Ligamentum coronarium, welches am Austritt der Vena cava caudalis aus der Leber entspringt. Von dort ziehen beide Plicae triangulares nach dorsolateral.

Die hintere Hohlvene (Vena cava caudalis) tritt am kaudomedianen Rand des Processus caudatus in die Leber ein und findet ihren Ausgang kraniodorsal des Supraportalappens. Die A. hepatica und die Pfortader (Vena portae) treten ventral der Vena cava in die Leberpforte (Porta hepatis). Die Ratte besitzt keine Gallenblase. Gallengänge aus allen Leberlappen vereinigen sich zum Ductus choledochus. Dieser 12 bis 45 mm lange und im Durchmesser ein Millimeter grosse Gang kreuzt dorsal das Duodenum, zieht unter der Bauchspeicheldrüse (Pancreas), von der er Zufluss erhält, entlang und mündet etwa 20 mm distal vom Pylorus in einer ein Millimeter hohen Papille im Duodenum. Die Speiseröhre (Oesophagus) zieht über den dorsalen stumpfen Rand (Impressio oesophagica) des Processus caudatus (44). Die Leber erreicht 4,15 % des Gesamtkörpergewichts der Ratte (17).



**Abbildung 3:** Anatomische Darstellung der Rattenleber mit Blick auf die Facies visceralis (modifiziert nach 44).

#### **4.1.4 Tumorzellen**

Bei den verwendeten Tumorzellen handelte es sich um ein chemisch induziertes Adenokarzinom des Colon sigmoideum der Reihe CC 531 aus der Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg.

Die Wahl der verwendeten CC 531-Tumorzellen basierte einerseits auf Erfahrungen über die Reproduzierbarkeit und die Zuverlässigkeit im Lebermetastasenmodell aus früheren Projekten der Arbeitsgruppe, und andererseits auf dem vergleichbaren tumorbiologischen Verhalten dieses Tumors zu Lebermetastasen eines humanen kolorektalen Karzinoms: Die Angehorte dieser Tumoren liegt bei der Implantation in die Leber mittels Tumorzellsuspensionsverfahren bei 90 % ohne die Ausbildung weiterer extrahepatischer Tumoren. Die Proliferationsrate von 40-60 % entspricht der Proliferationsrate humaner kolorektaler Karzinome (49).

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Expressionsprofil von MMP -2, -9 und TIMP-1 bei CC 531-Zellen**

Die Expression beider Gelatinasen MMP-2 und -9, sowie von TIMP -1 wurde mit Hilfe einer RT-PCR überprüft. Hierfür wurde zuerst RNA aus den CC531-Zellen mittels Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) isoliert. Die RNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Um die MMPs, als auch deren natürliche Inhibitoren in der cDNA der CC531-Zellen nachzuweisen, erfolgte eine PCR mit genspezifischen Primern. Die Auswertung erfolgte mittels einer Gelelektrophorese.

Die Tumorzellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen und dann mit 3 ml Trypsin im Brutschrank für 5 min inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml RPMI-1640 resuspendiert und bei 1000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Trizol lysiert, mit 200 µl Chloroform versetzt und anschliessend 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase mit der darin enthaltenen RNA wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und abermals mit 600 µl Chloroform gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm, 4 °C) wurde die obere Phase wieder in ein neues Tube pipettiert und mit 1 ml Ethanol (p.a.) und 60 µl 3M Natriumacetat gefällt. Die gefällte RNA wurde 5 min bei 13.000 rpm (4 °C) pelletiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet bei 37 °C 5 min getrocknet. Danach wurde die RNA in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und 3 min bei 70 °C gelöst. Abschliessend erfolgte eine photometrische

Bestimmung der RNA-Konzentration. Zur Denaturierung der RNA wurden 4 µg RNA mit der entsprechenden Menge DEPC-H<sub>2</sub>O 5 min bei 70 °C erhitzt.

Ansatz für die Transkription:

- 8 µl 5 x Transkriptionspuffer
- 2 µl dNTP's (10 mM)
- 4 µg RNA (s.o.)
- 2 µl OligodT (40 µM)
- 4 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl RNAsin
- 2 µl Superscript II (200 U/µl)
- ad 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

Es erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C. Die reverse Transkriptase wurde bei 70 °C für 15 min inaktiviert.

Primer für die PCR:

MMP-2: Rmmp2-f: 5'-gAgTTggCAgTgCAATACC-3'  
Rmmp2-r: 5'-CATACTTTACgCggACCAC-3'

MMP-9: Rmmp9-f: 5'-TgTCATCCAgtTTTggTgTCgC-3'  
Rmmp9-r: 5'-TCTTgTCAgCgTCgAAgTTCg-3'

TIMP-1: Rtimep1-f: 5'-AgACCACCTTATACCAGcG-3'  
Rtimep1-r: 5'-gAgTgACAgTCATTgCTTg-3'

Ansatz für die PCR:

- 12,5 µl Ready-Taq-Mix (2 x)
- 0,5 µl Sense-Primer (20 pmol/µl)
- 0,5 µl Antisense-Primer (20 pmol/µl)
- 1,0 µl cDNA (s.o.)
- ad 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

Programm für die PCR:

3 min	95 °C	
1 min	95 °C	35 x
1 min	X °C	
1 min	72 °C	
10 min	72 °C	
∞	4 °C	

$X_{\text{MMP-2}} = 50 \text{ °C}$        $X_{\text{MMP-9}} = 55 \text{ °C}$        $X_{\text{TIMP-1}} = 56 \text{ °C}$

Die Auswertung der PCR erfolgte mittels einer Gelelektrophorese.

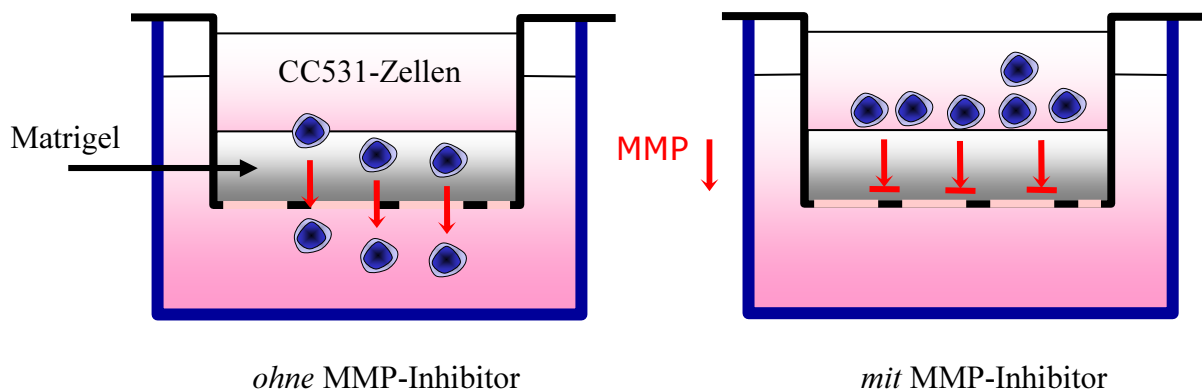
#### 4.2.2 Matrigel Invasionsassay

Die inhibierende Wirkung von Aktinonin auf MMPs wurde mit Hilfe eines Matrigelassays überprüft.

Das Matrigel (BD, Bedford) stellt ein Basalmembran-artiges Gel dar. Es wird vom Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)-Maustumor gebildet und enthält Collagen-IV, Laminin, Proteoglycane, matrixabbauende Enzyme, deren Inhibitoren sowie Wachstumsfaktoren.

Das Funktionsprinzip des Assays beruht auf der Migration der Tumorzellen durch das Matrigel, welche durch einen Serum-Konzentrationsgradienten ausgelöst wird. Das Invasionsverhalten der Tumorzellen sollte von dem MMP-Inhibitor Aktinonin gehemmt werden. Die Auswertung erfolgte durch das Auszählen der Zellen im Filter, welche durch das Matrigel diffundierten.

Filtereinsatz mit 8µm-Poren

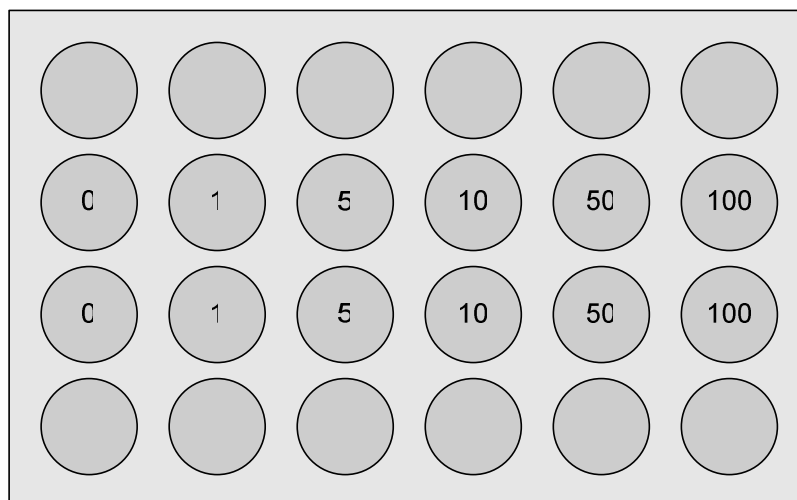


**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Matrigel Invasionsassays

Das Matrigel wurde über Nacht bei 4 °C aufgetaut. Pipettenspitzen, Transwell-Platten und Eppendorf-Tubes wurden auf -20 °C heruntergekühlt, da das Matrigel bei RT polymerisiert. Das Matrigel (10 ml) wurde in Portionen von 1,3 ml in Eppendorf-Tubes aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die für das jeweilige Experiment benötigten Aliquots wurden über Nacht bei 4 °C aufgetaut. Jeweils 100 µl wurden mit gekühlten (-20 °C) Pipettenspitzen in die vorgekühlten (4 °C) Transwell-Einsätze pipettiert und anschliessend für eine Stunde in den Brutschrank gestellt.

Die Tumorzellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen und dann mit 3 ml Trypsin im Brutschrank für 5 min inkubiert. Die Zellen wurden in 10 ml RPMI-1640 / 1 % FCS resuspendiert. Nach einer Zentrifugation bei 1000 rpm für 2 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml RPMI-1640 / 1 % FCS aufgenommen. Nun erfolgte die Zellzahlbestimmung und die Herstellung einer Zellsuspension mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml. Davon wurden je 200 µl auf das in den Transwell-Einsätzen befindliche Matrigel pipettiert. In die 24-Well-Platten unter den Transwell-Einsätzen wurden 600 µl RPMI-1640 / 20 % FCS / 1 % BSA (Sigma, Taufkirchen) pipettiert.

Die entsprechenden Volumina Aktinonin (s. Schema) wurden jeweils in die obere und untere Kammer pipettiert.



**Abbildung 5:** 24-Well-Platten mit Transwell-Einsätzen (Aktinonin-Pipettierschema [ $\mu\text{g/ml}$ ])

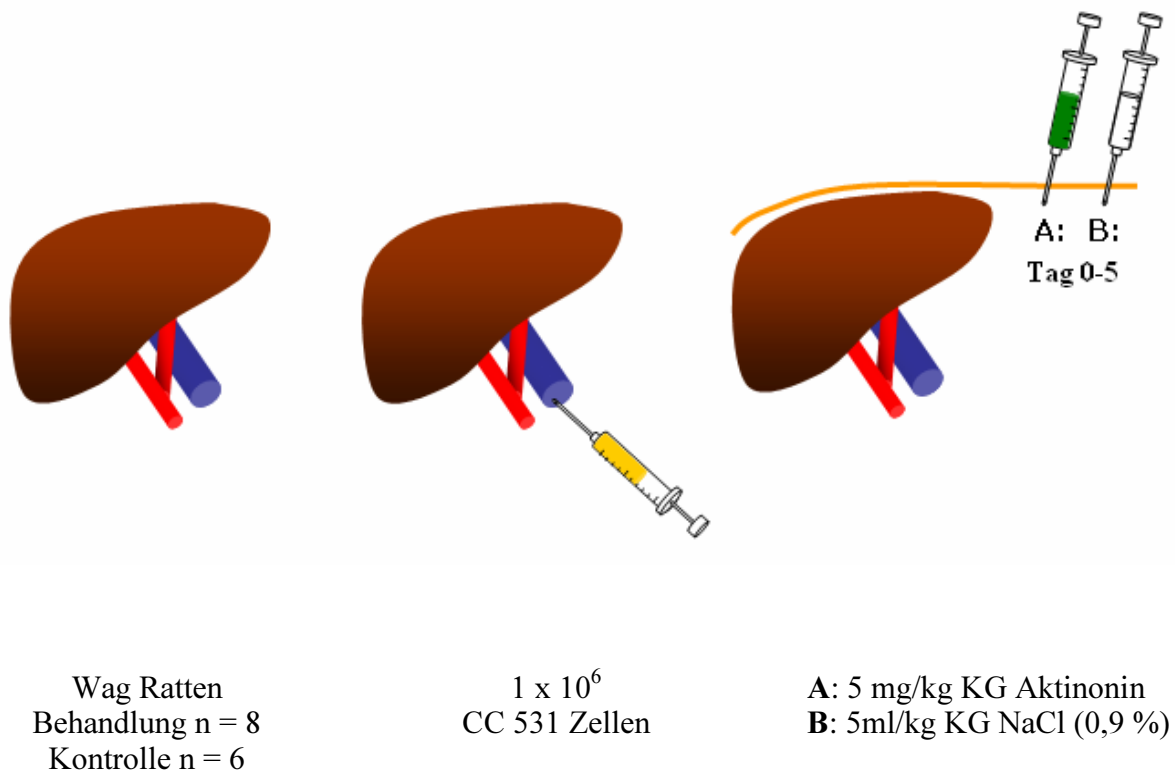
Der Versuchsansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte in der unteren Kammer ein Mediumwechsel (RPMI-1640 / 20 % FCS / 1 % BSA) und abermals eine Inkubation über Nacht bei 37 °C.



Das Matrigel wurde mit einem Q-Tip aus dem Transwell-Einsatz entfernt. Der Filter wurde mit 1 x PBS gewaschen (2 x 5 min). Danach wurde der Filter mit 4 % PFA / PBS fixiert und nochmals mit PBS (2 x 5 min) gewaschen. Die Zellen wurden 15 min mit Hämalaun (VWR, Darmstadt) gefärbt und danach 5 min in A. dest. gebläut. Mit einem Skalpel wurde der Filter vom Transwell-Einsatz gelöst und auf einem Objektträger mit Aquamount (VWR, Darmstadt) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung.

### 4.2.3 Diffuses Tumorimplantationsmodell

Den Ratten wurden einheitlich je eine Million CC531-Tumorzellen in die Pfortader, wie unter Punkt 4.2.4.1 beschrieben, implantiert. Dieses Implantationsmodell sollte die physiologische Metastasierung eines Kolorektalkarzinoms nachahmen. Dabei wurden die Tiere in zwei Gruppen (siehe Punkt 4.2.8) eingeteilt. Gruppe I stellte die Behandlungsgruppe dar, welche mit dem MMP-Inhibitor Aktinonin behandelt wurde. Gruppe II war die Kontrollgruppe, dessen Tiere lediglich nach der Tumorimplantation mit einer Salinelösung behandelt wurden. Die Zuteilung zu den jeweiligen Gruppen erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Die Behandlung wurde an dem Tag der Tumorimplantation begonnen und umfasste 5 Behandlungstage.



**Abbildung 6:** Skizzierter Versuchsaufbau des diffusen Tumorimplantationsmodells (portalvenös)

#### 4.2.4 Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation

Die Wahl des Tumorimplantationsverfahren fiel auf das Tumorzellsuspensionsverfahren, da das Fragmenttumorimplantationsverfahren aufgrund der Transplantation grosser Tumorgewebestücke (ein Millimeter im Durchmesser) starke Gewebereizungen verursacht und folglich immunologische Abwehrmechanismen induzieren könnte (77). Andererseits sollte gewährleistet werden, dass die gesamte Menge der Tumorzellen ( $1 \times 10^6$  CC 531-Zellen) injiziert wurde, was mittels des Suspensionsverfahren einfacher zu kontrollieren ist.

Die CC 531-Tumorzellen wurden in RPMI 1640 Medium (Sigma, Taufkirchen), welches mit 10 % fötalem Kälberserum (Seromed, Berlin) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Seromed, Berlin) komplettiert wurde, kultiviert.

$2 \times 10^6$  Zellen wurden mit 20 ml des Komplettmediums versetzt und in einer  $75 \text{ cm}^2$  Kulturflasche für 3-4 Tage bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die entstandenen Zellen adhäreren als Monolayer auf dem Flaschenboden.

Für die Herstellung der Tumorsuspension wurde das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und 1 x mit Phosphatpuffer (PBS, Seromed, Berlin) gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 3 ml Trypsin (Viralex Trypsin/EDTA, PAA Laboratories GmbH, Pasching), einem proteinspaltenden Enzym, und die Inkubation für 2-5 min im Brutschrank, da bei dieser Temperatur das Trypsin seine grösste Wirkung entfaltet und die Zellen enzymatisch von dem Flaschenboden ablösen kann. Danach wurden 10 ml des Komplettmediums in die Kulturflasche hinzugegeben. Das darin enthaltene fötale Kälberserum inhibiert die Reaktion und verhindert, dass das Trypsin die Tumorzellen schädigt. Anschliessend wurden die Zellen 10 x mit einer 10 ml Pipette resuspendiert, damit sich vereinzelt Zellklumpen lösen und in ein 15 ml Falcontube umgefüllt. Die Suspension wurde 2 min bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, das Zentrifugat abpipettiert und der Rückstand mit PBS (Seromed, Berlin) auf 10 ml aufgefüllt und resuspendiert. Für die Zellzählung wurden  $100 \text{ }\mu\text{l}$  dieser Suspension mit  $100 \text{ }\mu\text{l}$  Trypanblau (Merck, Darmstadt) versetzt, 2 min geschüttelt, kurz stehengelassen und dann in die Neubauerkammer pipettiert. Es wurden alle Zellen in den 4 grossen Eckquadraten ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl wird durch 4 (Anzahl der Quadrate) und durch 2 (Verdünnungsfaktor) dividiert. Das Ergebnis wurde mit 10 multipliziert (entspricht dem Volumen im Falcontube) und anschliessend mit  $10^4$  multipliziert (Faktor der Neubauerkammer, um die Zellzahl für 1 ml zu bestimmen). Nach der Berechnung der Zellzahl pro Milliliter wurde die Zellsuspension noch einmal zentrifugiert und das Zentrifugat abpipettiert. Der Rückstand wurde mit soviel PBS (Seromed, Berlin) aufgefüllt, dass sich eine Endkonzentration von einer Million Zellen pro 0,1 ml ergab.

#### **4.2.5 Operationsvorbereitung**

Um unnötigen Stress für die Tiere zu vermeiden, wurden die Tiere jeweils einzeln in den Operationsraum transportiert.

##### **4.2.5.1 Narkose**

Die Tumorzellimplantation und die Tumorbehandlung der Tiere mit Aktinonin erfolgten in Allgemeinnarkose. Hierfür wurden nach Feststellen des Körpergewichtes Xylazin (Rompun<sup>®</sup> 2 %, Bayer AG, Leverkusen) in einer Dosierung von 0,25 ml/kg Körpergewicht und Ketamin (Ketanest<sup>®</sup> 50 mg, Parke-Davis, Berlin) in einer Dosierung von 1 ml/kg Körpergewicht intramuskulär injiziert.

##### **4.2.5.2 Rasur und Lagerung**

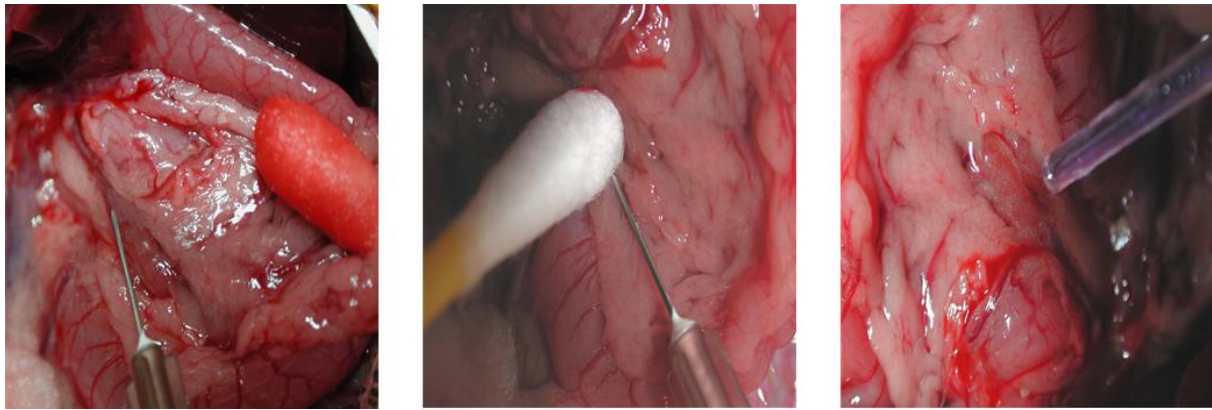
Den narkotisierten Tieren wurde der gesamte Ober- und Unterbauch rasiert. Anschliessend wurden sie in Rückenlage mit Haltegummis an den Vorder- und Hinterbeinen auf dem Operationstisch fixiert. Es folgte die Desinfektion der Haut des Bauches mit einer Jodlösung (B. Braun, Melsungen).

#### **4.2.6 Operative Eingriffe**

Sämtliche nachfolgend beschriebenen operativen Eingriffe erfolgten unter aseptischen Kautelen:

##### **4.2.6.1 Durchführung der Tumorzellimplantation**

Als Zugang erfolgte bei der Tumorzellimplantation die Laparotomie 0,5 cm unterhalb des rechten Rippenbogens. Nach schichtweisem Durchtrennen der Bauchdecke und Eröffnung des Peritoneums, wurde der Darm mobilisiert und auf eine sterile Gazekompressen ausserhalb des Tieres auf die rechte Seite gelagert. Weitere sterile Gazekompressen wurden darüber gelegt und der Darm wurde ständig mit NaCl feucht gehalten. Mit einer Spreizklemme wurde die Bauchhöhle gespreizt, um sich einen besseren Überblick über das OP-Feld zu verschaffen. Die Pfortader wird weitestgehend freipräpariert für die Tumorzellimplantation. Nun erfolgte die Injektion von 0,1 ml der unter Punkt 4.2.4 hergestellten Tumorzellsuspension (entspricht einer Million Zellen) in die Pfortader. Um ein retrogrades Zurückfliessen der Zellen zu minimieren, wurde etwa 30 sec. mit dem Herausziehen der Kanüle gewartet und die Punktionsstelle mit Acrylkleber (Histoacryl<sup>®</sup>, B. Braun, Melsungen) verschlossen.



**Abbildung 7:** Arbeitsschritte der Tumorzellimplantation in die Pfortader: Injektion der Tumorzellen, Rückzug der Kanüle unter Kompression des Stichkanals und Verschluss der Einstichstelle mit Acrylkleber.

Nach Abschluss der Tumorzellimplantation wurde der Darm wieder in die Abdominalhöhle zurückverlagert. Das Peritoneum und die Bauchmuskulatur wurden mit einer fortlaufenden Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (3 (36x) Dexon<sup>®</sup> II, B. Braun-Dexon GmbH, Spangenberg) verschlossen. Die Haut wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (5/0 Vicryl<sup>®</sup>, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) ebenfalls mit einer fortlaufenden Naht vernäht.

#### 4.2.6.2 Tumorbehandlung mit Aktinonin

Die Tumorimplantation erfolgte wie unter Punkt 4.2.6.1 beschrieben.

Diese Tiere wurden einschliesslich des Tages der Operation 5 Tage lang mit dem MMP-Inhibitor Aktinonin (5 mg, Fluka), (gelöst in 50 % Ethanol / 0,9 % NaCl – vom Hersteller empfohlen) behandelt (0,1 ml pro kg Körpergewicht). Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Dosierung und Dosis-Intervall haben sich nach Literaturangaben bei Mäusen als effektiv erwiesen (133) und wurden für das Rattenmodell übernommen.

#### 4.2.6.3 „Scheinbehandlung“ der Kontrolltiere

Die „Scheinbehandlung“ der Kontrolltiere sollte den natürlichen Verlauf der Metastasierung und Manifestation der Tumorzellen aufzeigen.

Da maligne Tumore im Wachstum eine spontane Nekroserate aufweisen, musste zur Evaluierung der experimentellen Behandlungsergebnisse ein Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren erfolgen. Auch hier wurde die Tumorimplantation wie unter Punkt 4.2.6.1 beschrieben durchgeführt. Diese Tiere wurden anstelle des Aktinonins mit NaCl (0,9 %; 0,1 ml pro kg Körpergewicht) über den gleichen Zeitraum (5 Tage) behandelt.

#### **4.2.6.4 Haltung der Tiere nach den operativen Eingriffen**

Zunächst wurden die Tiere unverzüglich nach der Operation zur besseren Regeneration für ca. 4 Stunden unter eine Rotlichtlampe gelegt.

Die Tiere wurden mindestens zu zweit in ausreichend grossen Käfigen untergebracht, welche bis zum 2. Tag nach der Operationsdurchführung mit Zellstoff ausgelegt waren. Nach dieser Latenzzeit wurde die Einstreu auf Sägespäne umgestellt. Die Ernährung der Ratten erfolgte wiederum mit Altromin<sup>®</sup> (Standard-Diät-Haltung für Ratten) und Wasser ad libitum aus der automatischen Tränkanlage.

Durch die Operation (Laparotomie) und Behandlung (intraperitoneale Injektion von Aktinonin, bzw. Vehikel-Lösung) erlitten die Ratten Schmerzen, die als mässig mit zwei bis drei Tagen Dauer eingeschätzt und entsprechend mit Schmerzmittel (Finadyne<sup>®</sup>) behandelt wurden.

Die Tiere wurden während der 14-tägigen Latenzzeit bis zum Tötungstermin bei einer Raumtemperatur von 20 °C ( $\pm 2$  °C), einer relativen Luftfeuchte von 55 % ( $\pm 5$  %) und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

#### **4.2.7 Euthanasie der Tiere und Probenentnahme**

Zu dem unter Punkt 4.2.8 angegebenen Zeitpunkt wurden die Tiere, wie unter Punkt 4.2.5.1 erläutert, narkotisiert und mittels einer intrakardialen Injektion mit Embutramid (T 61<sup>®</sup>, Intervet International GmbH, Wiesbaden) in einer Dosierung von 0,3 ml pro kg Körpergewicht getötet.

Über eine Medianlaparotomie wurde die Abdominalhöhle eröffnet und zur Entnahme der Leber der ligamentäre Halteapparat und die Vena cava inferior durchtrennt.

Einige Tumorproben wurden mit dem angrenzenden Leberparenchym zum einen in einer 10 %igen Formaldehydlösung (Sigma, Taufkirchen) fixiert und zum anderen in einem Plastikbecher mit einer 2-Methylbutanolösung (Roth, Karlsruhe) in flüssigem Stickstoff getaucht und in Kryoröhrchen überführt. Da die Siedetemperatur von flüssigem Stickstoff mit  $-183$  °C sehr nahe der Verflüssigungstemperatur ist, kann ein eingetauchtes, warmes Objekt den Stickstoff zum Verdampfen bringen. Der flüssige Stickstoff geht dabei in die Gasphase über und kann eine dünne Isolationsschicht um das Einfrieröhrchen bilden, welches die kryogene Wirksamkeit herabsetzt. Um eine konstante Gefriertemperatur zu erreichen und dieses als Isolationseffekt bezeichnete Phänomen zu vermeiden, wurde Isopentan (2-Methylbutan) verwendet.

Die Proben wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Formaldehydproben wurden über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in der Fixierlösung inkubiert.

#### 4.2.8 Versuchstiergruppen

Es wurden nach dem Zufallsprinzip zwei Gruppen mit zum einen 8, zum anderen 6 Tieren gebildet (Gruppe I und II): In der Gruppe I wurde die Behandlung mit dem MMP-Inhibitor Aktinonin durchgeführt. Gruppe II diente als Kontrollgruppe, in der die Tiere lediglich einer „Scheinbehandlung“ mit der Vehikel-Lösung (0,9 % NaCl) unterzogen wurden.

Die Tiere aus jeder Gruppe wurden nach 14 Tagen zur Bestimmung des Tumor replacements und Lebergewichts getötet.

Alle Versuchstiere waren frei von infektiösen Krankheiten.

Gruppe	Anzahl der Tiere (n)	Behandlung	Probenentnahme nach x Tagen (d)
I	8	Aktinonin 5mg/kg KG	14
II	6	„Scheinbehandlung“ 5 ml/kg KG (NaCl, 0,9 %)	14

**Tabelle 3:** Übersicht der Gruppeneinteilung mit jeweiliger Behandlung und Tötungszeitpunkt

#### 4.2.9 Messung der Metastasierung

Nach Entnahme der Leber wurde die Metastasierung in Form des geschätzten Tumor replacements in Prozent von zwei unabhängigen Personen beurteilt. Das Tumor replacement stellt hierbei den prozentualen Anteil des Tumorgewebes am Lebergesamtvolumen dar. Anschliessend wurde die Leber gewogen. Zur Dokumentation wurde die Leber als Ganzes und lamelliert in ca. 5 mm dicken Scheiben fotografiert. Das Peritoneum wurde auf Karzinosen überprüft. Eine Karzinose ist eine Durchsetzung des Körpers, oder nur bestimmter Organe, bzw. seröser Körperhöhlen, durch zahlreiche Tochtergeschwülste (Metastasen) (102).

## **4.2.10 Auswertekriterien**

### **4.2.10.1 Makroskopische Beurteilung des Tumor replacements**

Die makroskopische Beurteilung des Tumor replacements zum Tötungszeitpunkt, unmittelbar nach Entnahme der Leber und vor der Konservierung, erfolgte mittels Schätzung zweier voneinander unabhängigen Personen (wie unter Punkt 4.2.9 beschrieben).

Es erfolgte eine Schätzung anstelle einer Vermessung, weil aus Erfahrung das durch das diffuse Tumormodell entstandene Tumorgewebe nicht auszählbar ist.

### **4.2.10.2 Ex vivo Beurteilung des Matrigelassays**

Die Auswertung des Matrigelassays erfolgte mittels Auszählen der mit Hämalan gefärbten Zellen im Filter, welche durch das Matrigel diffundierten.

## **4.2.11 Statistische Analyse**

Der Parameter Tumor replacement wurde einer statistischen Analyse unterzogen.

Der Einfluss des Faktors der Operationsmethode wurde in den zwei Stufen Behandlung (Aktinonin) und Kontrolle (NaCl) mit dem Mann-Whitney-Test untersucht (7). Den Mann-Whitney-Test verwendet man für zwei unabhängige Proben, die von nichtnormalen Verteilungen stammen. Er beruht auf dem Vergleich von Rangsummen. Die errechnete Signifikanz ( $p$ ) betrug 0,003. Dieser signifikante Unterschied liegt auf dem 5 % Niveau. Zur Berechnung des Mann-Whitney-Test wurde das Statistikprogramm SPSS benutzt.

Aus den Ergebnissen des Tumor replacements, des Körpergewichts zum Tötungszeitpunkt, des Gewichtsverlaufs über 14 Tage, des Lebergewichts, sowie des relativen Lebergewichts der jeweiligen Tiere der Behandlungs- und Kontrollgruppe wurden das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ), der Median, die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ermittelt.