

Aus der Chirurgischen Klinik
Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Etablierung eines Tiermodells zur Untersuchung des Sinusoidalen
Obstruktionssyndroms in der Leber von Mäusen, behandelt mit Oxaliplatin, einem
VEGF-Inhibitor und anschließender Leberteileresektion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gregor Duwe

aus Bremen

Datum der Promotion: 18.12.2020

Veröffentlichung von Teilergebnissen der vorliegenden Arbeit

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Konferenzbeitrag (Abstract) veröffentlicht:

Knitter S, Duwe G, Beierle AS, Pesthy S, Führer K, Lippert S, Tang P, Reutzel-Selke A, Lohneis P, Schmuck RB, Schmelzle M, Sauer IM, Bahra M, Pratschke J, Andreou A. Inhibition of vascular endothelial growth factor protects against the development of oxaliplatin-induced sinusoidal obstruction syndrome in a murine model; Abstract ID: 95, 136. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 2019, München, Deutschland. *Innov. Surg Sci.*, 2019 Mar; 4 (Suppl 1): s1-s205

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
Abstract (Deutsch)	VII
Abstract (Englisch)	IX
1. Einleitung	1
1.1 Kolorektales Karzinom	1
1.2 Kolorektale Lebermetastasen – Multimodale Therapiekonzepte.....	3
1.2.1 Chirurgische Strategien zur Erweiterung der Resektabilität	5
1.3 Die Rolle der neoadjuvanten Chemotherapie in der multimodalen Therapie	9
1.4 Chemotherapie-assoziierte Hepatotoxizität.....	14
1.4.1 Steatosis Hepatis und Steatohepatitis.....	14
1.4.2 Sinusoidales Obstruktionssyndrom	15
1.4.3 Oxaliplatin-assoziiertes Sinusoidales Obstruktionssyndrom	17
1.4.4 Pathophysiologie des Sinusoidalen Obstruktionssyndroms	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Materialien	26
2.2 Tierversuche	29
2.2.1 Tierwahl und Tierhaltung.....	29
2.2.2 Experimenteller Plan und Gruppenübersicht.....	30
2.3 Ablauf der Therapeutika-Applikationen	32
2.4 Chirurgische Technik, postoperativer Verlauf und Finalisierungen	34
2.4.1 Ablauf der Leberteileresektion und perioperatives Anästhesiemanagement..	34
2.4.2 Sham-Operation.....	37
2.4.3 Postoperative Kontrollen und Behandlungen	38
2.4.4 Finalisierungen.....	39
2.5 Probengewinnung	39
2.6 Histologie und Immunhistochemie	40
2.6.1 Aufbereitung Formalin-fixierter Präparate	40
2.6.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	41
2.6.3 Histopathologische Klassifikation des Sinusoidalen Obstruktionssyndroms	42
2.6.4 Immunhistochemische Färbung: Antigen Ki-67.....	43
2.6.5 Immunhistochemische Färbung: 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrDu)	44
2.7 Molekularbiologische Methoden.....	45
2.7.1 Isolierung von RNA	45
2.7.2 Reverse Transkription	46
2.7.3 Echtzeit Polymerase-Ketten-Reaktion.....	47
2.8 Untersuchungen des Blutserums	49
2.8.1 Laborchemische Messungen von Serumparameter.....	49
2.8.2 Proteinbestimmung mittels Luminex Multiplex Assay.....	51
2.9 Relatives Lebergewicht und Milzgewicht.....	52
2.10 Statistik	53
3. Ergebnisse	54
3.1 Etablierung der optimalen Behandlungsdosis und Therapiedauer anhand der Toleranz der Behandlungen und Induktion des Sinusoidalen Obstruktionssyndroms	54

3.2 Dosisfindung von Oxaliplatin und einem VEGF-Inhibitor im Zusammenhang mit Gewichtsverläufen und Gesamtüberleben	57
3.3 Histopathologische Analyse des SOS: Dosisfindungsstudie	59
3.4 Etablierung der Methodik zur Evaluierung der Leberregeneration mittels immunhistochemischer Färbungen	62
3.5 Untersuchungen in einer großen Kohorte	63
3.6 Expressionsunterschiede von VEGF-A, VEGFR-1 und VEGFR-2 innerhalb der Behandlungsgruppen mittels quantitativer Echtzeit-PCR.....	66
3.7 Analyse relevanter Leberfunktions- und regenerationsmetabolite im Blutserum mittels Luminex Multiplex Assay	68
3.8 Laborchemische Untersuchungen zur Beurteilung der Leberfunktion	72
3.9 Analyse der relativen Leberregeneration und des relativen Milzgewichtes	76
4. Diskussion	78
4.1 Evaluation der Etablierung des Tiermodells und der Dosisfindungsstudie	79
4.1.1 Diskussion der Methodik des Tiermodells und der Dosisfindungsstudie	79
4.1.2 Diskussion der Ergebnisse des Tiermodells und der Dosisfindungsstudie ..	83
4.2 Diskussion der weiteren Ergebnisse	87
4.2.1 Histopathologische Untersuchungen der zweiten Versuchsreihe	87
4.2.2 Auswertung der weiteren Analysen der ersten Versuchsreihe	90
4.3 Zusammenfassung und Ausblick	97
5. Zusammenfassung	101
6. Literaturverzeichnis.....	102
7. Eidesstattliche Erklärung.....	121
8. Lebenslauf.....	122
9. Publikationsliste	125
10. Danksagung	126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hersteller der verwendeten Geräte	26
Tabelle 2: Hersteller der verwendeten Labormaterialien.....	27
Tabelle 3: Hersteller der verwendeten Chemikalien	28
Tabelle 4: Hersteller der verwendeten Medikamente.....	28
Tabelle 5: Hersteller der verwendeten Software	28
Tabelle 6: Hersteller der verwendeten Verbrauchsmaterialien (-Kits).....	29
Tabelle 7: Übersicht der Versuchsgruppen der ersten Versuchsreihe, h= Stunden.	31
Tabelle 8: Übersicht der Versuchsgruppen der zweiten Versuchsreihe, h= Stunden	32
Tabelle 9: Beispiel der Konzentrationszubereitung; VEGF-Antikörper: LEAF™ Purified anti-mouse VEGF-A Antibody	33
Tabelle 10: Überblick der verwendeten Medikamente sowie deren Applikationsformen und Dosierungen.....	40
Tabelle 11: Histopathologische Beurteilung des SOS nach Rubbia-Brandt et al. 2010 ¹⁴⁴	42
Tabelle 12: Reverse Transkription: Zusammensetzung eines 20 µl Reaktionsansatzes, welches für 2,00 µg RNA und einer Reaktion dient,	46
Tabelle 13: Primer-Sequenzen für die PCR (jeweils für die Spezies Maus)	47
Tabelle 14: PCR: Zusammensetzung eines 10 µl Reaktionsansatzes, welches für 2,00 µg mRNA dient	47
Tabelle 15: Übersicht der Versuchsgruppen (sortiert nach Kohorten/systematische Reihenfolge) des Vorversuchs, jeweils drei Tiere pro Versuchsgruppe; Ausfall jeweils in absoluten Zahlen; Körpergewicht jeweils arithmetisches Mittel; w= Wochen; *= Wert eines Versuchstieres, **= Mittelwert von zwei Versuchstieren; Grau hinterlegt sind die jeweils optimalen Therapieregime, die final ausgewählt worden sind	55
Tabelle 16: Übersicht der Versuchsgruppen mit Behandlungszeiträumen von 3, 4 und 5 Wochen auf Mortalität und sinusoidale Dilatationen	56
Tabelle 17: Histopathologische Ergebnisse der Behandlungsgruppen 11,12,13; w= Wochen; *= Ein Tier hat den gesamten Versuchsablauf überlebt, zwei Tiere wurden ausgewertet (zusätzlich des kurz nach der Operation verstorbenen Tieres, **= Auswertung von jeweils zwei Tieren, da jeweils ein Tier der Gruppen 12 und 13 zwischen dem ersten und zweiten postoperativen Tag verstorben ist.....	59
Tabelle 18: Übersicht der Versuchstierzahl in den verschiedenen Versuchsgruppen innerhalb der zweiten Versuchsreihe und dessen Mortalitätsquoten während der Behandlung.....	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Multimodale, interdisziplinäre Therapie kolorektaler Lebermetastasen	6
Abbildung 2: Therapeutischer Algorithmus (vereinfacht) zur Therapie kolorektaler Lebermetastasen nach Duwe G. et al. ⁷⁷	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren und dessen Rezeptoren	12
Abbildung 4: Klinische Befunde des Sinusoidalen Obstruktionssyndroms und dessen Bedeutung für eine Leberteilresektion nach Duwe G. et al. ⁷⁷	16
Abbildung 5: Pathophysiologische Abläufe der Entwicklung des Chemotherapie-induzierten Sinusoidalen Obstruktionssyndroms nach You A.H. et al. ¹⁸⁹	22
Abbildung 6: Schematische Zeichnung der Anatomie der murinen Leber und die Verläufe der Ligaturen der 2/3-Leberteilresektion nach Mitchell C. et al. ¹⁹⁹ . Zunächst wird der mittlere Lappen wenige Millimeter unterhalb der suprahepatischen Vena Cava abgetrennt. Anschließend erfolgt die Ligatur am medialen Ansatz des linken Lappens (der mittlere Lappen ist zum besseren Verständnis der anatomischen Verhältnisse in der Zeichnung hochgeklappt, jedoch in der OP zuvor, wie beschrieben, durchtrennt)	36
Abbildung 7: Oben links: Situs nach Eröffnung des Peritoneums; oben rechts: Unterfahren des mittleren Leberlappens mit 5-0 Seide; unten links: Durchtrennung des mittleren Leberlappens; unten rechts: Situs nach Absetzen des mittleren und linken Leberlappens	36
Abbildung 8: Operationsarbeitsplatz (unter dem blauen Abdecktuch befindet sich die elektronische Wärmeplatte)	37
Abbildung 9: Gewichtsverläufe der Versuchsgruppen 6, 8, 9 und 10, jeweils arithmetisches Mittel; Beschriftung der x-Achse: 1-5: jeweils Woche 1-5 der Applikationen, 6: Leberteilresektion, 7: postoperativer Tag 1 (24 h), 8: postoperativer Tag 2/Finalisierung (48 h); Beschriftung y-Achse: Körpergewicht in Gramm; w= Wochen	57
Abbildung 10: Gewichtsverläufe der Versuchsgruppen 11, 12 und 13, jeweils arithmetisches Mittel; Beschriftung der x-Achse: 1-5: jeweils Woche 1-5 der Applikationen, 6: OP (Leberteilresektion), 7: Postoperativer Tag 1 (24 h), 8: Postoperativer Tag 2/ Finalisierung (48 h); Beschriftung y-Achse: Körpergewicht in Gramm; w= Wochen; Gruppe 11 (VEGF-AK 5 mg): jeweils 2 Tiere vor dem ersten postoperativen Tag verstorben. Gruppe 12 (VEGF-AK 10 mg) und 13 (VEGF-AK 15 mg): jeweils 1 Tier nach dem ersten postoperativen Tag verstorben	58
Abbildung 11: Abbildung eines histologisch aufgearbeiteten Leberschnittes (2 µm Schnittdicke, H.E. Färbung) nach Leberteilresektion aus der Behandlungsgruppe 6 mg/kg KG Oxaliplatin für 3 Wochen, 10-fache Vergrößerung, pathologischer Befund: Keine histopathologischen Veränderungen	60
Abbildung 12: Abbildung eines histologisch aufgearbeiteten Leberschnittes (2 µm Schnittdicke, H.E. Färbung) nach Leberteilresektion aus der Behandlungsgruppe 8 mg/kg KG Oxaliplatin für 5 Wochen, 10-fache Vergrößerung, pathologischer Befund: Sinusoidale Dilatationen in der Zone 3 (nahe der Zentralvene) sowie endothelialen Schädigungen mit perisinusoidalen Einblutungen (siehe gelber Pfeil). Zusätzlich	

Zeichen einer hepatozellulären Schädigung („hepatocyte ballooning“, siehe grauer Pfeil) sowie moderaten, makrovesikuläre Steatosis (Zone 1 und 2)	60
Abbildung 13: Abbildung eines histologisch aufgearbeiteten Leberschnittes (2 µm Schnittdicke, H.E. Färbung) nach Leberteilresektion aus der Behandlungsgruppe 12 mg/kg KG Oxaliplatin für 5 Wochen, 10-fache Vergrößerung, pathologischer Befund: Es imponieren massive sinusoidale Dilatationen entlang aller Zentralvenen, hepatozelluläre Schädigungen, perisinusoidale Eiblutungen und Steatohepatitis	61
Abbildung 14: Abbildung eines histologisch aufgearbeiteten Leberschnittes (2 µm Schnittdicke, H.E. Färbung) nach Leberteilresektion aus der Behandlungsgruppe 11 mg/kg KG Oxaliplatin für 5 Wochen, 20-fache Vergrößerung, pathologischer Befund: Es zeigen sich ausgeprägte sinusoidale Dilatationen entlang der Zentralvenen als spezifisches histopathologisches Kriterium des SOS bei insgesamt milder Ausprägung hepatozellulärer Schädigungen und perisinusoidale Einblutungen	61
Abbildung 15: Beispielhafte immunhistochemische Färbung mit Ki-67 (8 mg kg/KG Oxaliplatin); links: Leber nach Leberteilresektion, rechts: Leber nach Finalisierung (48 Stunden)	62
Abbildung 16: Beispielhafte digitale Auswertung der immunhistochemischen Färbung (Ki-67)	62
Abbildung 17: Übersicht der Versuchstierzahl (insgesamt 196) der zweiten Versuchsreihe in absoluten Zahlen	64
Abbildung 18: Übersicht der Versuchsgruppen der zweiten Versuchsreihe und die jeweilige Anzahl der Versuchstiere mit und ohne induziertem SOS in absoluten Zahlen.....	65
Abbildung 19: Übersicht der Versuchsgruppen 14 und 15 der zweiten Versuchsreihe und die jeweilige Anzahl der Versuchstiere mit und ohne induziertem SOS; jeweils in absoluten Zahlen	65
Abbildung 20: Vergleich der Expression von VEGF-A in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung.....	66
Abbildung 21: Vergleich der Expression von VEGF-Rezeptor-1 in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	67
Abbildung 22: Vergleich der Expression von VEGF-Rezeptor-2 in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	67
Abbildung 23: Vergleich der Expression von VEGF im Blutserum in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	68
Abbildung 24: Vergleich der Expression von IL-10 im Blutserum in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS	

entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	69
Abbildung 25: Vergleich der Expression von TIMP-1 im Blutserum in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	70
Abbildung 26: Vergleich der Expression von Serpin-E1 im Blutserum in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	71
Abbildung 27: Vergleich der AST-Aktivität im Blutplasma in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	73
Abbildung 28: Vergleich der ALT-Aktivität im Blutplasma in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	73
Abbildung 29: Vergleich der Bilirubin-Aktivität im Blutplasma in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	74
Abbildung 30: Vergleich der Albumin-Aktivität im Blutplasma in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	74
Abbildung 31: Vergleich der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität im Blutplasma in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	75
Abbildung 32: Vergleich der relativen Leberregeneration in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung	76
Abbildung 33: Vergleich des relativen Milzgewichts in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung.....	77

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
BMI	Body Mass Index
bzw.	beziehungsweise
c. a.	circa
cm	Centimeter
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HR	Hazard Ratio
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
KI	Konfidenzintervall
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KRK	Kolorektale Karzinom
KRLM	Kolorektale Lebermetastasen
M	Mittelwert (mean)
MCT	Monocrotaline
mg	Milligramm
min	Minuten
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (Nichtalkoholische Fettleber- erkrankung)
OP	Operation
OR	Odds Ratio
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-1
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PVE	Portalvenöse Embolisation
RECIST	Response Evaluation Criteria for Solid Tumors
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RR	Relatives Risiko
SD	standard derivation (Standardabweichung)
sek	Sekunden
SOS	Sinusoidales Obstruktionssyndrom
Tbl.	Tabelle
TIMP-1	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases-1
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
v. a.	vor allem

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGF-AK	Vascular Endothelial Growth Factor Antikörper
VEGFR-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
5-FU	5-Fluorouracil

Abstract (Deutsch)

Einleitung: Im Rahmen der multimodalen Therapie von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen (KRLM) haben sich die Indikationskriterien für eine neoadjuvante Chemotherapie (CTX) stetig erweitert, insbesondere um mehr Patienten eine chirurgische Leberteilresektion und damit die einzige kurative Therapieoption zu ermöglichen. Hierbei hat sich gezeigt, dass eine Oxaliplatin-basierte CTX mit der Entwicklung des Sinusoidalen Obstruktionssyndroms (SOS) und höheren Komplikationsraten assoziiert ist. Ferner konnte durch eine zusätzliche Therapie mit dem „Vascular Endothelial Growth Factor“ Antikörper (VEGF-AK) Bevacizumab eine protektive Wirkung auf die Entwicklung des SOS beobachtet werden. Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Tiermodells des Oxaliplatin-induzierten SOS zur Untersuchung der zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse und der Rolle einer VEGF-AK-Therapie.

Methodik: In einer Versuchsreihe mit 39 Mäusen (C57BL/6J) wurden in 13 Versuchsgruppen unterschiedliche wöchentliche Dosierungen von Oxaliplatin (6, 8, 10, 11, 12 mg/kg KG) sowie Behandlungszeiträume (3, 4, 5 Wochen) zur Induktion des SOS bestimmt, ebenso eines zusätzlichen murinen VEGF-AK (5, 10, 15 mg/kg Körpergewicht (KG)). Anschließend erfolgte eine 2/3-Leberteilresektion, um die Leberregeneration nach 48 Stunden immunhistochemisch (Ki-67, BrdU) zu untersuchen. Das Gewicht der Versuchstiere wurde wöchentlich, postoperativ täglich gemessen. Die Leberpräparate wurden histopathologisch untersucht, sowie die Expression von VEGF, VEGFR-1 und VEGFR-2 mittels PCR analysiert. Das Blutserum wurde nach der Finalisierung laborchemisch analysiert (ALT, AST, AP, Albumin, Bilirubin) sowie für Proteinexpressions-Messungen mittels der Luminex Multiplex Assay Methode verwendet (VEGF, HGF, IL-6, IL-10, MMP-9, TIMP-1, Serpin-E1). Nach der Etablierung wurde eine zweite Versuchsreihe mit insgesamt 196 Tieren durchgeführt, die in fünf Behandlungsgruppen (Oxaliplatin, Oxaliplatin + VEGF-AK, drei Kontrollgruppen) und jeweils vier Finalisierungszeitpunkte (24, 36, 48, 72 Stunden) unterteilt und methodisch analog aufgearbeitet wurden.

Ergebnisse: Im Rahmen der Etablierung des SOS Tiermodells konnte sowohl eine Dosierung von 11 mg Oxaliplatin/kg KG bei einem Behandlungszeitraum von fünf Wochen zur Induzierung des SOS, als auch eine Dosierung des zusätzlichen VEGF-AK von 10 mg/kg KG für weiterführende Untersuchungen ermittelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Behandlungszeitraum sowie die Dosierungen jeweils sehr kritische Grenzwerte zwischen der beabsichtigten Wirkung und schwerwiegenden Nebenwirkungen (Mortalität) darstellen. Die präoperative Entwicklung des Körpergewichtes zeigte sich als wichtigster Prognoseparameter für den weiteren intra- und postoperativen Verlauf.

Schlussfolgerung: Es konnte erstmalig ein Mausmodell des Oxaliplatin-induzierten SOS etabliert werden, in dem zusätzlich die Therapie mit einem murinen VEGF-AK untersucht wurde. Des Weiteren erlaubt das Modell eine erweiterte Leberteileresektion und einen postoperativen Untersuchungszeitraum. Dieses Modell stellt eine wichtige Grundlage für weitergehende Tiermodelle dar, um ein besseres Verständnis des SOS und dessen Behandlung zu entwickeln.

Abstract (Englisch)

Introduction: The use of neoadjuvant chemotherapy for patients with colorectal liver metastases has been steadily increased in order to enable more patients curative liver resection and improving long-term survival. However, the use of oxaliplatin based chemotherapy has been associated with specific liver injury, called sinusoidal obstruction syndrome (SOS), leading to higher intra- and postoperative complication rates. Interestingly, administration of bevacizumab, an inhibitor of VEGF (VEGF-AB) has been described to decrease the rate of SOS. This study aims to establish a mice model to demonstrate SOS induction by oxaliplatin and evaluating the effect of additional anti-VEGF treatment.

Methods: First, C57BL/6J mice (n= 39) were treated with different doses of oxaliplatin (6, 8, 10, 11, 12 mg/ kg body weight (bw)) weekly, each in different treatment periods (3, 4, 5 weeks). Likewise, the optimal dose of VEGF-AB has been established (5, 10, 15 mg/kg bw). Afterwards, animals underwent two-third liver resection and were culled 48 hours later to assess liver regeneration by immunohistochemistry staining (Ki-67, BrdU). Body weight was measured weekly and daily after operation. Liver biopsies were examined histopathologically and expression rates of VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 were quantified by PCR technique. Blood samples were taken after death to measure liver function by laboratory tests (ALT, AST, alkaline phosphatase, albumin, bilirubin), while various protein expression rates were assessed by Luminex Multiplex Assay technique (VEGF, HGF, IL-6, IL-10, MMP-9, TIMP-1, Serpin-E1). Second, 196 mice were treated and analyzed in the same manner in five different groups (oxaliplatin, oxaliplatin + VEGF-AB, three control groups), each culled in four different groups (24, 36, 48, 72 hours after resection) in order to compare the two major treatment groups.

Results: Aiming to establish a SOS mice model Oxaliplatin treatment with 11 mg/kg bw for five weeks was developed as reproducible schedule to induce SOS, next to the additional treatment of 10 mg/kg bw VEGF-AB for further investigations. It was demonstrated that the treatment periods and doses had very critical threshold values concerning the intended effect and serious side effects (mortality). Preoperative body weight was seen to be the most important prognostic value for intra- and postoperative course.

Conclusion: We have developed the first reproducible model of oxaliplatin induced SOS, which also enables evaluating additional anti-VEGF treatment. Moreover, this model allows to perform major liver resection, including an extended postoperative period for (liver) regeneration analysis. Finally, this new mouse model represents an important experimental fundament to improve treatment of SOS.

1. Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

Im Jahr 2014 war das kolorektale Karzinom (KRK) nach Angaben des Robert Koch Institutes mit einem prozentualen Anteil von 13,9 % unter Männern die dritthäufigste, sowie unter Frauen mit 12,3 % die zweithäufigste Tumorlokalisation in Deutschland¹. Hierbei schließt die Definition des KRK alle Kolonkarzinome (colon ascendens, -transversum-, -descendens und -sigmoideum) und des Rektums ein. Insgesamt traten im Jahr 2014 33.120 Neuerkrankungen bei Männern sowie 27.890 bei Frauen auf, mit einer 5-Jahres Prävalenz von 112.500 (Männer) bzw. 95.000 (Frauen). Die relative 5-Jahres Überlebensrate liegt für beide Geschlechter um die 62 %². Damit stellt das KRK bei beiden Geschlechtern mit 13.580 (Männer) und 11.932 (Frauen) Sterbefällen die dritthäufigste, krebsbedingte Todesursache in Deutschland dar¹. Diese relativen Verhältnisse unter allen Krebserkrankungen sind nahezu identisch im Vergleich zu europäischen sowie US-amerikanischen epidemiologischen Daten³⁻⁵. Weltweit werden 1.650.000 Neuerkrankungen und 835.000 Todesfälle für das KRK im Jahr 2015 angegeben⁶. Wenn die Erkrankung im seltenen Fall bereits vor dem 50. Lebensjahr auftritt, ist dies mit einem prognostisch deutlich schlechteren Krankheitsverlauf assoziiert⁷⁻⁹.

Bei der überwiegenden Mehrzahl der KRK handelt es sich um Adenokarzinome (mehr als 90 %), die zumeist ursprünglich aus gutartigen Vorstufen (Adenome) eines adenomatösen Polypen entstanden sind und von denen sich ca. 1 % über einen mehrstufigen Prozess genetischer und epigenetischer Mutationen sowie dysplastischer Veränderungen zu einem malignen Tumor entwickeln (Adenom-Karzinom-Sequenz)^{10,11}. Daher wächst das Risiko der Erkrankung auch zunehmend mit steigendem Alter an, was sich an dem mittleren Erkrankungsalter von 72 Jahren (Männer) bzw. 75 Jahren (Frauen) zeigt¹².

Hinsichtlich der Ätiologie sind neben genetischen Ursachen auch Umweltfaktoren von entscheidender Bedeutung. Insbesondere bei einigen hereditären Erkrankungen steigt das Risiko der Erkrankung deutlich an. Vordergründig sind autosomal-dominant vererbte hereditäre KRK Syndrome zu nennen, die mit einem sehr hohen KRK Erkrankungsrisiko einhergehen, wie beispielsweise die Familiäre Adenomatöse

Polyposis oder das Lynch-Syndrom (Hereditäres Nicht Polypöses KRK), die zusammen für ca. 5 % aller KRK Krankheitsfälle ursächlich sind¹³⁻¹⁵. Patienten mit adenomatösen Polypen (relatives Risiko von ca. 3,5 % bis 6,5 % bei Polypen > 1 cm) oder vorangegangene kolorektale Karzinome (1,5 % bis 3 % entwickeln ein KRK innerhalb eines Jahres nach Resektion des Primarius) haben ebenso ein erhöhtes Erkrankungsrisiko¹⁶. Bei betroffenen Familienangehörigen ersten Grades mit KRK besteht ein zweifach erhöhtes Risiko im Vergleich zur Normalbevölkerung¹⁷. Ebenso haben Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie der Colitis Ulcerosa (5-15-fach erhöhtes Risiko) und dem Morbus Crohn (vergleichbar erhöhtes Risiko wie bei Colitis Ulcerosa, jedoch ist die Datenlage hier weniger eindeutig) ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung des KRK¹⁸.

Neben diesen klinisch manifesten Risikofaktoren, die maßgeblich auf hereditären Erkrankungen beruhen, nehmen mit Blick auf die Gesamtpopulation der Erkrankten auch Umweltfaktoren einen entscheidenden Einfluss ein. Hierbei ist unter anderem Tabakkonsum zu nennen, mit einem signifikant erhöhten Risiko im Vergleich zu Personen, die nie geraucht haben ((Relatives Risiko (RR): 1,18; Konfidenzintervall (KI): 1,11-1,25)), basierend auf einer Meta-Analyse von 106 Beobachtungsstudien¹⁹. Adipositas spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle, mit einem moderat erhöhten Risiko ((Hazard Ratio (HR): 1,23, 95 %; KI 1,14-1,34)), basierend auf einer Meta-Analyse mit 13 Studien^{20,21}. Ebenso führt erhöhter Alkoholkonsum²² und Diabetes mellitus²³ zu einem höheren Risiko. Bezüglich des Einflusses der Ernährung sind die Daten zwar weniger evident, jedoch scheint der langjährige, vermehrte Verzehr von rohem Fleisch sowie einer ballaststoffarmen Ernährung mit einem erhöhten Risiko assoziiert²⁴⁻²⁶.

Des Weiteren lässt sich ein niedriger sozioökonomischer Status mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziieren, von einem bis zu 30 % erhöhtem Risiko im Vergleich zwischen Studienpopulationen des niedrigsten und des höchsten sozioökonomischen Status²⁷. Zusammenfassend werden diese modifizierbaren Risikofaktoren wie Adipositas, Bewegungsmangel, Tabakkonsum und einer ungesunden Ernährung in der aktuellen Literatur für ein Drittel bis zu der Hälfte als primäre Ursache aller Krankheitsfälle des KRK gezählt²⁷⁻²⁹.

Trotz der multiplen und heterogenen Risikofaktoren hat die Inzidenzrate des KRK in Deutschland insgesamt, im Gegensatz zu vielen anderen europäischen Nationen, für beide Geschlechter in allen Altersgruppen ab 55 Jahren seit 2004 kontinuierlich abgenommen³⁰. Diese positive Entwicklung lässt sich primär mit der in Deutschland seit 2002 ab dem 55. Lebensjahr eingeführten Früherkennungs-Koloskopie erklären, die von entscheidender Bedeutung ist. Diese ermöglicht es, vor dem ätiologischen Hintergrund des langjährigen Prozesses der Transformation von benignen adenomatösen Vorstufen zu malignen Adenokarzinomen, rechtzeitig gutartige Raumforderungen wie Polypen endoskopisch zu entfernen oder das KRK noch in einem frühen Stadium mit entsprechend guter Prognose zu diagnostizieren^{30,31}. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass klinische Symptome des KRK häufig erst sehr spät und in einem fortgeschrittenen Stadium auftreten, zumeist als Resultat des verdrängenden Tumorwachstums in das Darmlumen bzw. in angrenzenden anatomischen Strukturen^{9,32,33}.

1.2 Kolorektale Lebermetastasen – Multimodale Therapiekonzepte

Nach US-amerikanischen Daten weisen ca. 15 % bis 25 % aller Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose des KRK bereits Metastasen^{34,35}. Aufgrund der Gefäßanatomie von Darm und Rektum sind sowohl lymphogene als auch hämatogene Metastasierungswege möglich. Hierbei sind v. a. Leber, Lunge, Knochen und das Peritoneum betroffen. Das KRK ist ab dem Zeitpunkt einer Fernmetastase, unabhängig der Lokalisation, nach aktueller TNM Klassifikation als UICC (Union for International Cancer Control) Stadium 4 definiert, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 25-40 %³⁶⁻³⁸. Da der venöse Rückfluss des Darmes primär in die Vena porta hepatis geleitet wird, stellt die Leber das hämatogen am häufigsten betroffene Organ der Metastasierung dar. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des KRK weisen um die 25 % der Patienten hepatische Metastasen auf (synchrone Lebermetastasen), während weitere ca. 25 % der Patienten nach Abschluss der Therapie des kolorektalen Primarius Lebermetastasen entwickeln (metachrone Lebermetastasen)^{3,5,39-41}. Die Therapieoptionen sind in beiden klinischen Kontexten sehr komplex, da diverse Strategien, basierend auf den pathologischen und klinischen Stadien des KRK, als auch der anatomischen Ausprägung und biologischen Charakterisierung der Lebermetastasen, vorliegen^{42,43}.

Bei jeder onkologischen Erstdiagnose und insbesondere auch bei der Behandlung kolorektaler Lebermetastasen (KRLM) ist es von entscheidender Bedeutung, dass die einzelnen Patientenfälle in einer fachlich interdisziplinären Konferenz mit einem erfahrenen Team aus Onkologen, Chirurgen, Radiologen, Strahlentherapeuten und Pathologen diskutiert werden. In den vergangenen zwei Jahrzehnten haben folgende Entwicklungen in der Therapie kolorektaler Lebermetastasen maßgeblich zu signifikanten Verbesserungen beigetragen: (1.) Erweiterung der chirurgischen Resektionstechniken, (2.) Entwicklung und Etablierung von neo- und adjuvanten Chemotherapieregimen, sowie (3.) Optimierungen radiologischer Diagnostik und Interventionsmöglichkeiten.

Den Erfolg dieser stetig verbesserten Therapieoptionen zeigt die kontinuierliche Entwicklung der Langzeitüberlebensraten von zwei großen, onkologischen US-amerikanischen Zentren („The University of Texas MD Anderson Cancer Center“, Houston, Texas sowie „Mayo Clinic Rochester“, Rochester, Minnesota), die ihre retrospektiv untersuchten Daten im Jahr 2009 veröffentlichten⁴⁴: Für Patienten in den Jahren 1990 bis 1997 betrug die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate noch 9,1 %, in den Behandlungsjahren 1998 bis 2000 bereits 13 % und schließlich 19,2 % in dem Zeitraum 2001 bis 2003. Das mediane Gesamtüberleben stieg von 14,2 Monaten zum Zeitpunkt der Diagnose von 1990 bis 1997 auf 29,3 Monate im Zeitraum 2004 bis 2006. Diese signifikanten Verbesserungen konnten sowohl auf die gestiegene Anzahl an Leberteilresektionen (primäre Entwicklungen in den Jahren 1998 bis 2004) sowie auf die vermehrte Anwendung neuer Chemotherapieregime (insbesondere in den Jahren 2004 bis 2006) zurückgeführt werden.

Dabei ist wichtig, dass nach R0-Resektion (makroskopisch und mikroskopisch komplette Entfernung mit Sicherheitsabstand; Tumorfreier Schnittrand mikroskopisch: $\geq 1 \text{ mm} = R0$, $\leq 1 \text{ mm} = R1$) des Primarius im multimodalen Therapiekonzept⁴² (neo- und oder adjuvante Chemotherapie bzw. Radiochemotherapie bei Rektumkarzinom, und chirurgischer R0-Resektion) bezüglich der Lebermetastasen eine kurative Therapieoption nach chirurgischer Resektion der Lebermetastasen besteht, so dass eine Resektion immer angestrebt werden sollte^{40,41,45}. In diesem Fall können, bei operativen Mortalitätsraten von unter 5 %, in erfahrenen Zentren für hepato-pankreato-biliärer Chirurgie 5-Jahres

Überlebensraten von bis zu 58 %, mit einem Gesamtdurchschnittswert bei 40 % erreicht werden⁴⁵⁻⁵¹. Patienten, die ein rezidivfreies Überleben von 10 Jahren erreichen, können als geheilt angesehen werden, was in ausgesuchten Patientengruppen ca. einer von sechs Patienten nach der chirurgischen Resektion vorweisen kann⁵².

1.2.1 Chirurgische Strategien zur Erweiterung der Resektabilität

Eine entscheidende klinische Herausforderung liegt in der Tatsache, dass zum Zeitpunkt der Diagnose lediglich ca. 20 % der Patienten chirurgisch resektable Lebermetastasen aufweisen⁴¹. Die Fortschritte und Verbesserungen in den chirurgischen Techniken der Leberteileresektion, wie beispielsweise Leberparenchym schonendere Resektionsverfahren, haben in den vergangenen Jahren stetig mehr Patienten eine Resektion ermöglicht^{48,52,53}. Im Zuge dessen wurden die Grenzen der Resektabilität (mit dem primären Ziel einer R0-Resektion) kontinuierlich erweitert. Wenngleich hierfür auch keine eindeutige Definition vorliegt, lässt sich nach aktuellem, internationalen Konsens die chirurgische Grenze der Resektabilität mit folgenden Voraussetzungen definieren: (1.) ein verbleibendes, kalkuliertes Lebervolumen von mindestens 20 % (mittels CT-Untersuchung), (2.) Erhaltung von mindestens zwei angrenzenden Lebersegmenten, sowie (3.) ein ausreichend arterieller und portalvenöser Zu- und Abfluss sowie Gallenabfluss (siehe Abb. 1)^{41,54-56}. Die komplexe und stetig erweiterte Indikationsstellung basiert auch auf die parallel verbesserten radiologischen Bildtechniken (v. a. der CT-Untersuchung), die eine sehr genaue Befundung der anatomischen Lokalisation der Metastasen und damit eine optimierte Operationsplanung ermöglichen⁵⁷. Diese chirurgischen Maximen setzen sowohl aus chirurgischer, als auch anästhesiologischer und onkologischer Perspektive einen guten gesundheitlichen Allgemeinzustand voraus.

Beim Auftreten einer synchronen Metastasierung bestehen grundsätzlich drei chirurgische Strategien, die bei optimaler Selektion der Patienten keine onkologisch signifikanten Unterschiede aufweisen, so dass die Einzelfallentscheidung stets individuell zu treffen ist. Grundsätzlich haben Patienten mit synchronen Lebermetastasen jedoch eine tendenziell schlechtere Prognose, da häufig eine aggressivere Tumorbilologie vorliegt⁵⁸.

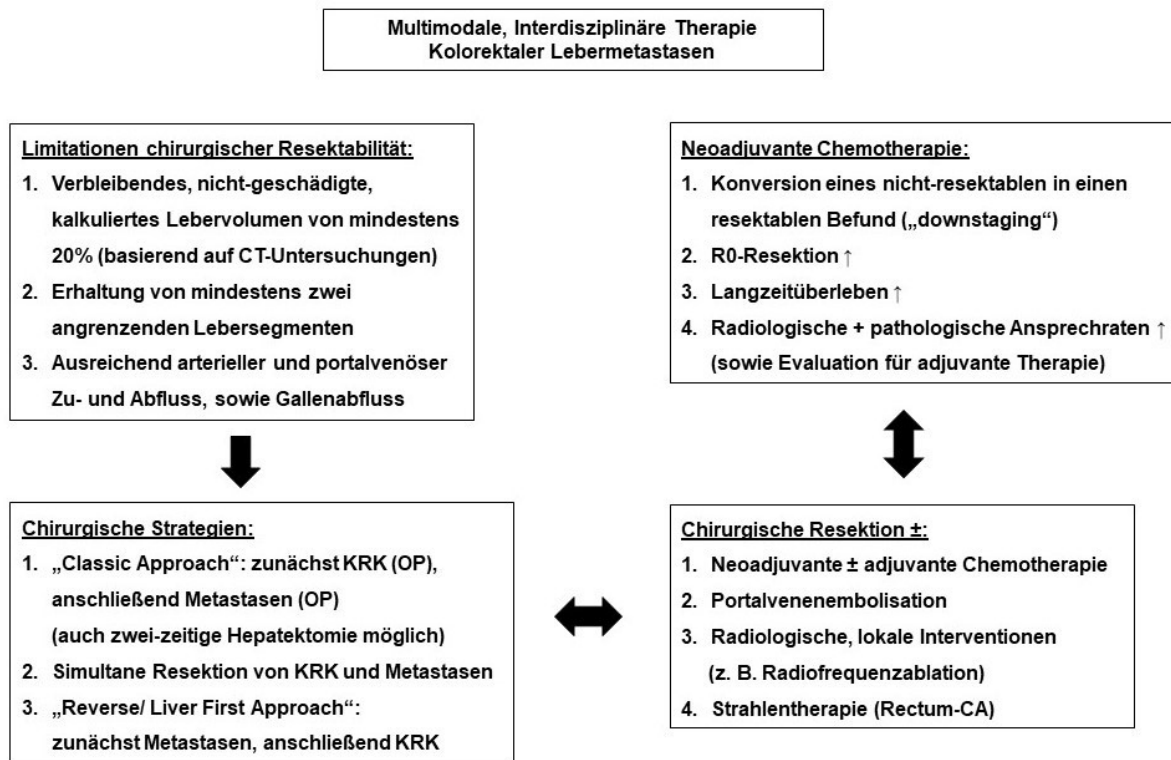


Abbildung 1: Multimodale, interdisziplinäre Therapie kolorektaler Lebermetastasen

Die erste chirurgische Option stellt die simultane Resektion des KRK sowie der Lebermetastasen dar („combined approach“)⁵⁹. Diese Methode kann v. a. in einem frühen Stadium des KRK und einer gleichzeitig geringen Tumorlast der Leber angewandt werden^{60,61}. Das Verfahren hat einerseits den Vorteil verkürzter Krankenhausaufenthalte sowie nur einer Operation und dessen perioperativen Belastungen und Komplikationen, andererseits ist es auch in einigen Studien mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben assoziiert^{41,62,63}. In der zweiten Strategie werden zunächst die Lebermetastasen reseziert und in einer zweiten Operation das KRK („liver first“ oder „reverse approach“)³⁸. Diese Option ist beispielsweise bei rektalen Karzinomen von Vorteil, die gut strahlentherapeutisch behandelt werden können und gleichzeitig primär resektable Lebermetastasen mit einer geringen Tumorlast vorliegen⁶³. Hierbei ist die frühe Risikoreduktion einer weiteren Metastasierung in der Leber von Vorteil, jedoch bedarf es einer engmaschigen Kontrolle des Primarius zum Ausschluss eines Progresses im weiteren Verlauf^{64,65}. Da bei dieser Option häufig primär resektable Lebermetastasen vorliegen, hat die neoadjuvante Chemotherapie zur Behandlung der Lebermetastasen keine relevante Bedeutung. Die dritte und am meisten angewandte Strategie sieht zunächst die Resektion des Primarius vor, häufig gefolgt von einer

systemischen Chemotherapie und in einer anschließenden, zweiten Operation die Resektion der Lebermetastasen („classic approach“ oder „staged approach“)^{62,66}. Dieses Vorgehen ist besonders bei Patienten mit klinisch symptomatischem KRK, wie beispielsweise Folgen einer Obstruktion, Perforation und Blutungen zu empfehlen, um weitere Komplikationen zu vermeiden. Des Weiteren lassen sich mit dieser Methode auch große Tumorbefunde in der Leber gut und sicher behandeln.

Sowohl bei der klassischen Variante der Behandlung synchroner Lebermetastasen („staged approach“), als auch beim Auftreten metachroner Lebermetastasen (Auftreten erst im Verlauf/ nach Behandlung des initialen KRK) wird bezüglich des weiteren therapeutischen Vorgehens zwischen primär resektablen und primär nicht resektablen Lebermetastasen unterschieden (siehe Abb. 2). Primäre Resektabilität beruht, wie zuvor auf Grundlage des aktuellen, internationalen Konsens beschrieben, auf dem postoperativ verbleibenden Lebervolumen, dem Erhalt von mindestens zwei angrenzenden Lebersegmenten und einem ausreichenden biliären- und venösen Abfluss, sowie einer ausreichenden arteriellen- und portalvenösen Versorgung. Auf Grundlage von CT-Aufnahmen wird das verbleibende Lebervolumen bestimmt, da mindestens 20 % gesundes Lebervolumen postoperativ vorhanden sein muss, um eine sichere Hepatektomie durchführen zu können und Komplikationen bis hin zum Leberversagen und Tod zu vermeiden⁶⁷⁻⁶⁹. Falls eine Resektion aus operativer Sicht durchzuführen ist, jedoch das postoperative Lebervolumen als zu gering kalkuliert wird, so stellt die präoperative portalvenöse Embolisation (PVE) eine sichere Methode zur Induktion der Hypertrophie des verbleibenden Lebergewebes dar^{69,70}. Neben individuellen Behandlungsstrategien ist die PVE bei verbleibenden Lebervolumina von unter 30 % indiziert⁴¹. Darüber hinaus lässt sich die tatsächlich erzielte Hypertrophie auch als Prädiktor für die Leberregenerationskapazität verwenden, so dass damit bereits Aussagen auf postoperative Komplikationen sowie Gesamtüberleben abgeleitet werden können^{70,71}. Neben der PVE stellt bei multifokalem und lobulär beidseitigem Metastasenbefall der Leber und einer zunächst nicht kurativer Resektabilität die zwei-zeitige Hepatektomie („two-stage hepatectomy“) eine weitere Therapiemöglichkeit dar^{72,73}. In einer ersten Operation wird die größtmögliche Anzahl an Metastasen reseziert, zumeist eine linkslaterale Resektion, gefolgt von einer zweiten Operation, die meist eine rechtsseitige Hemihepatektomie darstellt⁵⁴. Das Verfahren wurde in mehreren Studien mit Erfolg

etabliert und ist bei ausgewählten Patienten und erfahrenen Operateuren eine sichere und onkologisch effektive Methode^{55,74}. Der entscheidende Vorteil liegt in der kompensatorischen Leberregeneration zwischen der ersten und zweiten Operation, die zusätzlich mit einer PVE erhöht werden kann^{41,54,75,76}. Ebenso kann eine kurzzeitige, systemische Chemotherapie durchgeführt werden, um die verbleibende Tumorlast sowie deren Wachstum zu reduzieren. In einem großen Patientenkollektiv mit fortgeschrittenen bilateralen Lebermetastasen konnte für Patienten nach einer zwei-zeitigen Hepatektomie im Vergleich zu einem Patientenkollektiv, das ausschließlich chemotherapeutisch behandelt wurde, in einem 3-Jahres-Zeitraum ein Überlebensvorteil von 84 % gegenüber 42 % ($p < 0.001$) gezeigt werden⁵⁵. In dieser Studie haben alle Patienten zunächst eine systemische Chemotherapie erhalten. Bei einem guten radiologischen Ansprechen (kein verändertes Tumorwachstum oder verringertes Tumolvolumen) basierend auf den „Response Evaluation Criteria for Solid Tumors“ (RECIST-Kriterien) wurde die erste Operation durchgeführt, gefolgt von einer PVE und anschließender zweiter Resektion. Eine systematische Übersichtsarbeit von 10 Studien konnte ebenso demonstrieren, dass die 5-Jahres Überlebensrate nach zweizeitiger Resektion bei 42 % mit einem mittleren Gesamtüberleben von 37 Monaten betrug⁷² und die Ergebnisse damit vergleichbar sind mit denen nach ein-zeitiger Resektion^{75,76}.

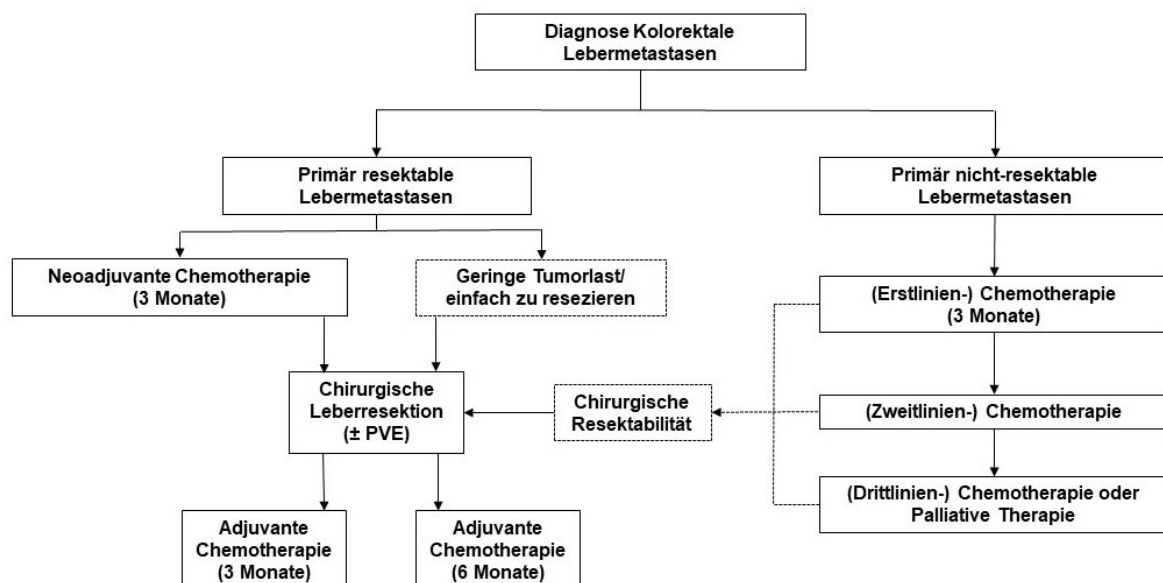


Abbildung 2: Therapeutischer Algorithmus (vereinfacht) zur Therapie kolorektaler Lebermetastasen nach Duwe G. et al.⁷⁷

1.3 Die Rolle der neoadjuvanten Chemotherapie in der multimodalen Therapie

Der Fortschritt chirurgischer Techniken lässt sich in Hinblick auf die onkologischen Behandlungserfolge in Gesamtbetrachtung der chemotherapeutischen Therapieentwicklungen sehen. Dabei ist analog wie zuvor unter chirurgischer Perspektive zwischen einer primär resektablen und einer primär nicht resektablen Ausgangssituation zu unterscheiden.

Die Möglichkeit der Konversion initial nicht resektabler in potenziell resektable Lebermetastasen wurde bereits 1996 von Henri Bismuth beobachtet⁷⁸. Patienten, die mit dem ursprünglichen Ziel einer Hemmung der Progression des Metastasenbefalls chemotherapeutisch behandelt wurden, entwickelten unter der Therapie teilweise einen chirurgisch resektablen Befund und konnten erfolgreich operiert werden. In den folgenden Jahren wurde die neoadjuvante (präoperative) Chemotherapie bei primär nicht-resektablen Lebermetastasen in klinischen Studien eingeführt, mit dem Ziel der Reduzierung der Tumormasse und einer darauffolgenden Möglichkeit der chirurgischen Resektion sowie einer Beurteilung der Chemosensitivität für folgende adjuvante Chemotherapien nach erfolgreicher Resektion^{74,79-81}. Nach erfolgreichen Optimierungen der ursprünglich primär auf 5-Fluorouracil (5-FU) basierten Chemotherapieregime⁴⁴ erzielte die Kombination von 5-FU, Folinsäure und dem Platin-Derivat Oxaliplatin (FOLFOX4) in einer der ersten Phase-II-Studien eine Ansprechrate von 60 % sowie eine Konversionsrate in resektable Metastasen bei 40 % der Patienten⁸². Daraufhin wurden in diversen weiteren Studien mit verschiedenen Chemotherapieregimen Konversionsraten von zunächst inoperablen Befunden in einen resektablen Zustand zwischen 10 % und ca. 35 % demonstriert^{80,83-90}. Des Weiteren besteht kein relevanter Unterschied in den 5-Jahres-Überlebensraten und der postoperativen Mortalität im Fall der sekundär resezierten Metastasen^{91,92}. Es muss jedoch kritisch betrachtet werden, dass bei diesen internationalen Studien in einem Zeitraum von über 10 Jahren keine einheitliche Definition der Resektabilität vorlag, so dass eine hohe individuelle Varianz der einzelnen chirurgischen Zentren beachtet werden muss. Dennoch stellte diese neue Therapieoption in Anbetracht der initial geringen Anzahl von Patienten mit resektablen Metastasen (ca. 20 %) klinisch sehr relevante Erfolge dar, so dass die neoadjuvante Chemotherapie bei ausgewählten Patienten eine zuvor nicht existierende Chance auf eine kurative Therapie ermöglicht⁴¹.

Im Jahr 2008 wurde die EORTC-Studie 40983 („European Organisation for Research and Treatment of Cancer“) als erste prospektive, randomisierte Multi-Center-Studie veröffentlicht, in der Patienten mit initial resektablen Metastasen entweder nach damaligem Standard direkt operiert und anschließend adjuvant mit FOLFOX4 (Oxaliplatin, Folinsäure, 5-FU) therapiert worden sind, während Patienten in der Vergleichsgruppe zunächst eine neoadjuvante Chemotherapie mit FOLFOX4 erhielten und anschließend die Leberteilresektion sowie adjuvante Chemotherapie folgten⁹³. Dabei zeigte sich ein absoluter Unterschied im 3-Jahres progressionsfreien Überleben von 8,1 % (Steigerung von 28,1 % auf 36,2 %; $p=0,041$) sowie von 9,2 % bei allen resezierten Patienten (Steigerung von 33,2 % auf 42,4 %; $p=0,025$) aufgrund der neoadjuvanten Chemotherapie. Die chirurgische Mortalität wurde bei weniger als 1 % angegeben. Die Langzeitüberlebensdaten konnten 5 Jahre später mit einem medianen „Follow-Up“ von 8,5 Jahren jedoch keine signifikanten Unterschiede aufzeigen⁹⁴. Diese Schlüsselpublikation demonstrierte erstmalig Vorteile bezüglich des verbesserten progressionsfreien Überlebens, während sich trotz einer höheren Rate an reversiblen postoperativen Komplikationen (25 % versus 16 %, $p=0,04$) in der Gruppe mit neoadjuvanter Chemotherapie kein Unterschied in der Mortalität aufzeigte (1 % in beiden Studienarmen).

Die systemischen Chemotherapieregime, die in der Behandlung KRLM v. a. auf Oxaliplatin oder Irinotecan basierten Kombinationen wie FOLFOX oder FOLFIRI (5-FU, Folinsäure, Irinotecan) fußen, konnten durch die Entwicklung humanisierter monoklonaler Antikörper optimiert werden. Vordergründig ist hier der Antikörper Bevacizumab zu nennen, der an den „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) bindet⁹⁵, sowie die Antikörper Cetuximab und Pantinumab, die jeweils an dem „Endothelial Growth Factor Receptor“ (EGFR) binden⁹⁶. Insgesamt sechs randomisierte Phase-II- und Phase-III-Studien untersuchten die Wirkung von Cetuximab (jeweils im Vergleich als zusätzliche Therapie zu FOLFOX bzw. FOLFIRI), jedoch mit kontroversen Ergebnissen. Dabei zeigten drei der Studien („OPUS“, „CRYSTAL“ und „CELIM,“) signifikant verbesserte Ansprechraten, höhere Konversionsraten im Sinne der Resektabilität sowie einen größeren Anteil an R0-Resektionen⁹⁷⁻¹⁰⁰. Vergleichbare Ergebnisse eines verbesserten progressionsfreien Überlebens sowie auch der Gesamtüberlebensrate wurden ebenso in großen randomisierten Studien mit dem Antikörper Pantinumab in Kombination mit

FOLFOX4 bei Patienten beschrieben, die nicht das mutierte KRAS-Gen (Wildtyp) aufwiesen^{101,102}. Dagegen demonstrierten drei weitere Studien („The New EPOC randomized controlled trial“, „NORDIC VII“, „COIN“) keine Verbesserung in den Ansprechraten, im progressionsfreien Überleben sowie auch in den Gesamtüberlebensraten¹⁰³⁻¹⁰⁵. In der Studie „The New EPOC Randomized Controlled Trial“ wurde sogar eine Verschlechterung des progressionsfreien Überlebens aufgrund der zusätzlichen Gabe von Cetuximab verzeichnet (14,1 Monate versus 20,5 Monate, $p = 0.030$)¹⁰⁵.

Zeitgleich wurden umfangreiche klinische Studien mit dem VEGF-AK Bevacizumab (siehe Abb. 3) in Kombination mit Oxaliplatin sowie Irinotecan basierten Chemotherapieregimen durchgeführt. Bei Patienten mit primär nicht resektablen Metastasen konnten in mehreren großen Studien signifikant verbesserte Ansprechraten und progressionsfreie Überlebens- sowie Gesamtüberlebensraten durch die zusätzliche Gabe von Bevacizumab demonstriert werden^{95,106-110}. Im Jahr 2004 wurde die erste große Phase-III-Studie mit 813 Patienten veröffentlicht (Irinotecan-Fluorouracil-Leucovorin mit und ohne Bevacizumab), die ein verlängertes progressionsfreies Überleben von 10,6 Monaten im Vergleich zu 6,2 Monaten ($p < 0,001$) sowie ein verlängertes medianes Gesamtüberleben von 20,3 Monaten im Vergleich zu 15,6 Monaten ($p < 0,001$) aufzeigte⁹⁵. Eine weitere bedeutende Phase-III-Studie aus dem Jahr 2008, die 1401 Patienten einschloss und XELOS versus FOLFOX4, sowie daraufhin in Kombination mit Bevacizumab bzw. einem Placebo verglich, demonstrierte ebenfalls ein verlängertes progressionsfreies Überleben von 9,4 Monaten im Vergleich zu 8 Monaten ($p < 0,0023$) und ein verlängertes medianes Gesamtüberleben von 21,3 Monaten im Vergleich zu 19,9 Monaten ($p < 0,001$)¹⁰⁷.

Nachdem 2008 erstmals in der „EORTC“ Studie von Nordlinger et al. eine Verbesserung im Krankheitsverlauf durch eine neoadjuvante Chemotherapie bei primär resektablen Metastasen demonstriert wurde, konnten auch in dieser Ausgangssituation weitere Verbesserungen durch die zusätzliche Gabe von Bevacizumab gezeigt werden. In einer Phase-II-Studie mit 56 Patienten wurde nach sechs Zyklen Capecitabine, Oxaliplatin und Bevacizumab eine durchschnittliche Ansprechrate von 73,2 % erzielt sowie eine R0-Resektion in 52 von 56 Patienten erreicht, während drei Monate nach Operation bei 55 der Patienten ebenfalls eine

normale Leberfunktion- und regeneration gemessen wurde¹¹¹. Vergleichbare Ergebnisse wurden in einer weiteren Phase-II-Studie mit 39 Patienten erzielt, die nach Behandlung mit FOLFIRI und Bevacizumab Ansprechraten von 66,7 % sowie R0-Resektionsraten von 84,6 % erreichten¹¹². Die verbesserten Resektionsraten sind von entscheidender klinischer Bedeutung, da eine R0-Resektion im Vergleich zu einer R1-Resektion weiterhin einen signifikant positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben hat und somit die neoadjuvante Chemotherapie auch bei primär resektablen Metastasen bei ausgewählten Patienten ihren Stellenwert eingenommen hat¹¹³. Bereits vorherige Studien, die allein Oxaliplatin-basierte Chemotherapieregime ohne zusätzliche Antikörper untersucht haben, zeigten deutlich höhere R0-Resektionsraten durch eine neoadjuvante Vorbehandlung^{82,89,90,114,115}.

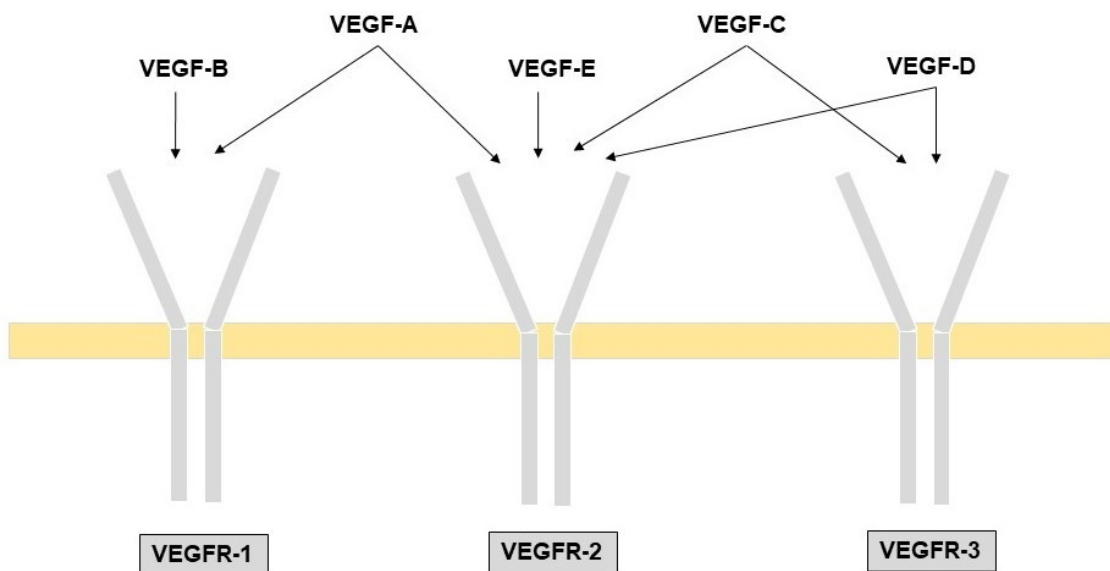


Abbildung 3: Schematische Darstellung der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren und dessen Rezeptoren

In Anbetracht der geringen Anzahl an Patienten, die einen primär resektablen Tumorbefund aufweisen, ist es weiterhin von klinischer Relevanz, die Patientengruppe mit potenziell resektablen Metastasen nach einer neoadjuvanten Chemotherapie in einen resektablen Befund zu verhelfen. Im Jahr 2011 demonstrierte eine Phase-II-Studie mit 21 Patienten, die potenziell resektable Metastasen aufwiesen, nach sechs Zyklen FOLFOX6 und Bevacizumab pathologische Ansprechraten von 57,1 %, eine Resektionsrate von 61,9 % sowie ein medianes Überleben von 22,5 Monaten nach einem Beobachtungszeitraum von 38,8

Monaten¹¹⁶. Eine vergleichbare multizentrische Studie mit 26 Patienten berichtete von Resektionsraten von 23,1 %¹¹⁷. In Kombination mit Capecitabine und Oxaliplatin (CAPOX) wurden in einer weiteren multizentrischen Studie mit insgesamt 46 Patienten nach nur vier Therapie-Zyklen durchschnittliche Ansprechraten von 78 % sowie eine Konversionsrate von 40 % gezeigt¹¹⁸.

Zusammenfassend konnte in den vergangenen Jahren in diversen Studien der positive Effekt durch die zusätzliche Gabe von Bevacizumab zu den etablierten Chemotherapieregimen dargelegt werden, sowohl bei nicht resektablen und potenziell resektablen, als auch bei primär resektablen kolorektalen Lebermetastasen^{111,112,119,120}. Eine zusätzliche Bedeutung gewinnt die neoadjuvante Chemotherapie, um mit Hilfe der Analyse radiologischer sowie pathologischer Ansprechraten Patienten zu identifizieren, die besonders gut bzw. schlecht auf die Chemotherapie ansprechen. Das radiologische Ansprechen wird anhand der RECIST-Kriterien klassifiziert, während für das pathologische Ansprechen anhand von Biopsien oder Resektionspräparaten die prozentuale Anzahl an vitalen Tumorzellen bestimmt wird^{121,122}. Adam et al. haben beschrieben, dass ab einer Anzahl von mehr als drei Lebermetastasen das Gesamtüberleben mit dem radiologischen Ansprechen nach neoadjuvanter Chemotherapie signifikant korreliert und damit u. a. Patienten identifiziert werden können, die bei schlechtem Ansprechen nicht von einer zusätzlichen Resektion profitieren würden¹²³. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Bevacizumab, unabhängig der Anzahl der Behandlungszyklen, das pathologische Ansprechen verbessert¹²⁴. Zusätzlich korreliert das pathologische Ansprechen als unabhängige Variable signifikant mit einem verbesserten Gesamtüberleben¹²⁵. Im Jahr 2009 wurde von Chun et al. eine bedeutsame Studie veröffentlicht, die neue Kriterien für das radiologische Ansprechen bei Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie mit Bevacizumab vorstellt, die im Vergleich zu den RECIST-Kriterien signifikant besser mit dem tatsächlichen pathologischen Ansprechen auf die Chemotherapie korrelieren, als auch darüber hinaus mit dem Gesamtüberleben der Patienten¹²⁶.

Es lässt sich zusammenfassen, dass Bevacizumab in Kombination mit Oxaliplatin- bzw. Irinotecan-basierten Chemotherapieregimen in dem gesamten multimodalen Therapieverlauf klinisch relevante Vorteile hinsichtlich der radiologischen und

pathologischen Ansprechraten und damit der optimierten Behandlungsstrategien aufweist. Des Weiteren führt die Behandlung mit Bevacizumab im ausgewählten Kontext auch zu onkologischen Verbesserungen in den verschiedenen Patientengruppen bezüglich des progressionsfreien Überlebens, RO-Resektionsraten sowie den Gesamtüberlebensraten.

1.4 Chemotherapie-assoziierte Hepatotoxizität

1.4.1 Steatosis Hepatis und Steatohepatitis

Die Entwicklung der erweiterten Indikationsstellung von Chemotherapieregimen in der multimodalen Behandlung kolorektaler Lebermetastasen und insbesondere in der neoadjuvanten Therapie führte zu einer besonderen Bedeutung Chemotherapie-assoziiierter Leberschädigungen und den damit verbundenen Komplikationen¹²⁷. Die Verwendung von 5-FU ist bei einer Inzidenz zwischen 30 % und 47 % mit radiologisch nachweisbarer Steatosis hepatis assoziiert, die durch eine zunehmende Akkumulation von Triglyceriden in den Hepatozyten charakterisiert ist, als reversibel gilt und damit auch als milde Form der nichtalkoholischen Fettleber (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) definiert ist¹²⁸⁻¹³⁰. Allerdings konnte bisher kein kausaler Zusammenhang einer Behandlung mit 5-FU und der Entwicklung einer Steatosis hepatis endgültig bewiesen werden, ebenso sind keine relevanten klinischen Komplikationen bekannt. Jedoch sind z. B. adipöse Patienten aufgrund der ohnehin höheren Inzidenz des Vorliegens einer Adipositas-bedingten NAFLD einem höheren Risiko ausgesetzt, neben einer erhöhten Rate an postoperativen Komplikationen aufgrund von pathophysiologisch zugrundeliegenden Komorbiditäten, beispielsweise einem Diabetes mellitus^{127,131,132}. Dagegen liegt eine größere Studienlage vor, die von gehäuftem Auftreten einer Irinotecan induzierten Steatohepatitis berichtet^{128,133,134}. Im Vergleich zu der Steatosis hepatis stellt die Steatohepatitis einen weiter fortgeschrittenen Krankheitsverlauf der NAFLD mit aktiven inflammatorischen Prozessen dar, die zu irreversiblen fibrinösen Umbauprozessen führen und sich langfristig zu einer Leberzirrhose entwickeln können^{135,136}. Die größte Studie hierzu von Vauthey et al. aus dem Jahr 2006 zu Chemotherapie-assoziiierter Hepatotoxizität beschreibt nach Behandlung mit Irinotecan bei Patienten mit einem Body-Max-Index (BMI) von $\leq 25 \text{ kg/m}^2$ das Auftreten einer Steatohepatitis bei 12 % sowie bei Patienten mit einem BMI von $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ bei 25 %¹³³. Wie auch bei der 5-FU assoziierten Steatosis hepatis ist die zugrundeliegende Pathogenese der

Irinotecan assoziierten Steatohepatitis noch wenig verstanden. Auf Grundlage bisheriger Untersuchungen sind diese Formen der Leberschädigung auf eine mitochondriale Dysfunktion zurückzuführen, die zu einer Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt und über weitere molekularbiologische Kaskaden (Lipidperoxidation, Induktion inflammatorischer Zytokine und Fas-Rezeptor vermittelte Apoptose) zum Zelluntergang der Hepatozyten¹³⁷⁻¹⁴⁰. Dennoch ist die Steatohepatitis, insbesondere bei adipösen Patienten, mit einem signifikanten Einfluss auf die postoperative Komplikationsrate sowie Mortalität aufgrund einer mangelnden Regenerationsfähigkeit der Leber assoziiert^{133,141,142}.

1.4.2 Sinusoidales Obstruktionssyndrom

Im Jahr 2004 beschrieb Rubbia-Brandt et al. erstmalig das spezifische Auftreten des SOS als histopathologische Leberschädigung bei 34 von 43 Patienten (78 %) mit KRLM, die mit Oxaliplatin-basierten Chemotherapieregimen behandelt und einer anschließenden Leberteileresektion unterzogen worden sind¹⁴³. Das SOS wird nach Rubbia-Brandt et al. in vier Stadien klassifiziert (0: „absent“, 1: „mild“, 2: „moderate“, 3: „severe“), basierend auf einer histopathologischen Beurteilung der Dilatation der hepatischen Sinusoide, der Atrophie der Hepatozyten, der perisinusoidalen Fibrose sowie einer nodulären regenerativen Hyperplasie¹⁴⁴. Terminologisch ist das SOS auch unter der äquivalenten, basierend auf dem aktuell pathophysiologischen Verständnis jedoch als inakkurat anzusehenden Bezeichnung „Venöse okklusive Leberkrankheit“ (oder auch „Lebervenenverschlusskrankheit“; „veno-occlusive disease“), bekannt¹⁴⁵. Die „Venöse okklusive Leberkrankheit“ wurde erstmalig 1920 in der Fachzeitschrift „Lancet“ als „Senico Disease“ in Südafrika beschrieben¹⁴⁶. Frederick C. Willmot und George W. Robertson untersuchten systematisch einen damals epidemieartigen Krankheitsausbruch, der sich primär durch abdominelle Beschwerden, Erbrechen und Aszites auszeichnete. Sie konnten durch systematische Untersuchungen der betroffenen Personengruppen sowie auch darauffolgenden tierexperimentelle Studien den Krankheitsausbruch auf verunreinigte Lebensmittel mit den Pflanzen „Senecio llicifolius“ und „Senecio Burchelli“ zurückführen, die sich v. a. in Weizenprodukten sowie Kräuter (-tees) wiederfanden. Seit ca. vier Jahrzehnten ist das SOS v. a. als lebensbedrohliche Komplikation nach myeloablativer Stammzelltransplantation bekannt und wurde in diesem Kontext erstmalig 1979 beschrieben^{147,148}. Dabei gilt das SOS neben

interstitiellen Pneumonien, Infektionen und der „Graft-versus-Host-Reaktion“ als häufigste Todesursache bei Patienten nach Transplantation aufgrund hochdosierter Chemotherapie^{149,150}. Das SOS ist in diesem Kontext mit einer durchschnittlichen Inzidenz von 8 % bis 14 % durch den Symptomkomplex Gewichtsverlust, Hepatomegalie, Ikterus und Aszites gekennzeichnet und kann im fortgeschrittenen Stadium mit einer bis zu über 80-prozentigen Mortalität zum Multiorganversagen führen (siehe Abb. 4)^{149,151,152}. Nachdem Rubbia-Brandt et al. das SOS im Jahr 2004 erstmalig auch bei Patienten mit KRLM beschrieben, konnten folgend mehrere Studien die Ergebnisse bestätigen und Inzidenzraten zwischen 19 % bis 52 % darlegen^{133,143,153}. Eine Meta-Analyse aus dem Jahr 2012 schlussfolgerte bei Oxaliplatin-basierten neoadjuvanten Chemotherapieregime ein 2,2-fach höheres Risiko zur Entwicklung eines SOS¹³⁶.

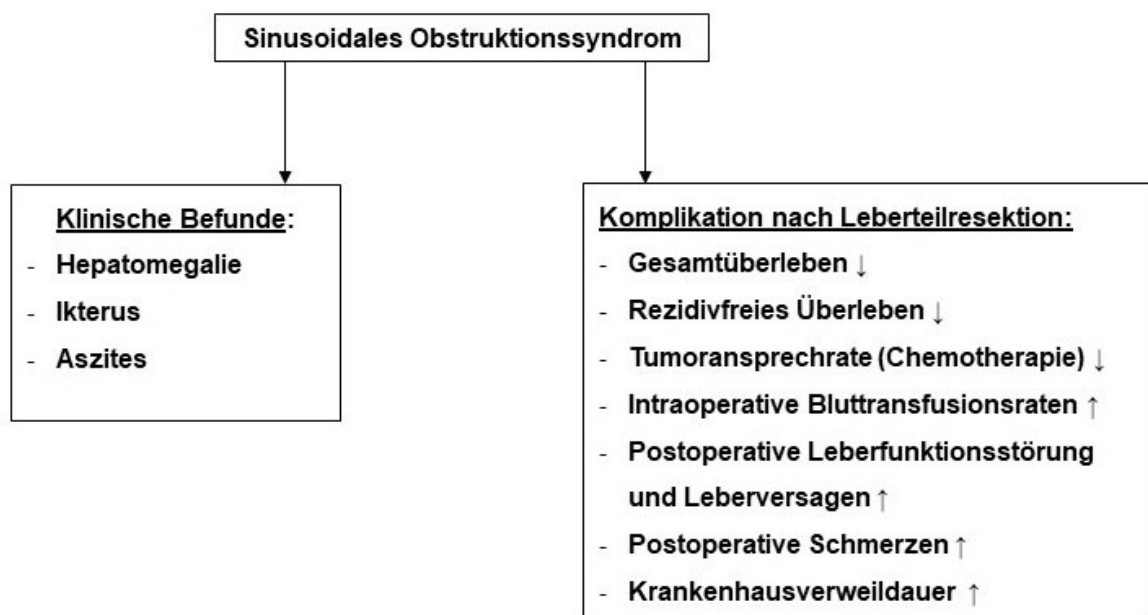


Abbildung 4: Klinische Befunde des Sinusoidalen Obstruktionssyndroms und dessen Bedeutung für eine Leberteilresektion nach Duwe G. et al.⁷⁷

1.4.3 Oxaliplatin-assoziiertes Sinusoidales Obstruktionssyndrom

Bereits in der EORTC 40983 Phase-III-Studie aus dem Jahr 2008, die erstmalig den Vorteil einer neoadjuvanten Chemotherapie bei Patienten mit resektablen KRLM demonstrierte, wurde eine höhere Rate an reversiblen postoperativen Komplikationen aufgrund der Oxaliplatin-induzierten Chemotherapie im Vergleich bei Patienten ohne neoadjuvanter Chemotherapie festgestellt (25 % versus 16 %, $p=0,04$)⁹³. Eine pathologische Analyse des tumorfreien Lebergewebes der Resektionspräparate von 57 Patienten aus der Studie ermittelte zwar ein häufigeres Auftreten sinusoidaler Schädigungen bei Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie (48 % versus 11 %, $p=0,003$), jedoch konnte keine signifikante Korrelation zu gleichzeitig höheren Morbiditätsraten gezeigt werden¹⁵⁴. Ähnliche Ergebnisse konnten 2006 Vauthey et al. in ihrer retrospektiven Studie zeigen, in der zwar ein höheres Auftreten Oxaliplatin-assoziiertes sinusoidaler Schädigungen nachgewiesen wurde (19 % versus 2 %; $p<0,001$), jedoch ohne höhere postoperative Morbiditäts- sowie Mortalitätsraten¹³³. Demgegenüber sind auch diverse Studien veröffentlicht worden, die andere Ergebnisse bezüglich der klinischen Relevanz bei Auftreten des SOS darlegen. In einer retrospektiven Studie von Aloia et al. wurden Patienten nach neoadjuvanter chemotherapeutischer Behandlung mit 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin untersucht und dabei deutlich höhere Raten an erheblichen vaskulären Pathologien im tumorfreien Lebergewebe im Sinne eines SOS nachgewiesen (52 % versus 18 %, $p=0,01$), als auch damit assoziiert ein höherer Bedarf an intraoperativen Bluttransfusionen (Erythrozytenkonzentrate)¹⁵⁵. Der Bedarf an intraoperativen Bluttransfusionen bei einer ausgedehnten Leberteileresektion („major resection“) konnte in einer Patientenkohorte mit KRLM unabhängig einer vorherigen neoadjuvanten Chemotherapie als Risikofaktor für postoperative Komplikationen dargestellt werden (66 % versus 16 %, $p=0,007$)¹⁴². Des Weiteren publizierte die Gruppe um Nakano et al. bei Patienten nach Oxaliplatin basierter neoadjuvanter Chemotherapie ein vermehrtes Auftreten sinusoidaler Schädigungen, die mit einer höheren Rate an postoperativen Komplikationen sowie einem längeren Krankenhausaufenthalt signifikant korrelierten (40 % versus 6,3 %, $p=0,026$)¹⁵⁶. Dabei ist zu vermerken, dass in dieser Studie die Patienten durchschnittlich neun Zyklen an Chemotherapie erhielten und diesbezüglich zu beachten ist, dass bereits mehrfach beschrieben wurde, dass die Dauer/Anzahl der chemotherapeutischer Behandlungen unabhängig

der Wahl der Therapeutika eine korrelierende hepatotoxische Wirkung darstellt^{155,157,158}. Eine Studie von Kishi et al. konnte eine Behandlung mit mehr als neun Zyklen Oxaliplatin-basierter Chemotherapie sowohl mit einer höheren Rate sinusoidaler Schädigungen (42 % versus 26 %, $p= 0.17$), als auch mit einem vermehrten Auftreten einer postoperativen Leberinsuffizienz in Verbindung setzen (11 % versus 4 %, $p= 0,035$), ohne dass Oxalilatin dabei die pathologische Ansprechrate verbesserte¹⁵⁷. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass bei Patienten mit KRLM mehr als sechs Zyklen einer neoadjuvanten Chemotherapie mit höheren Komplikationsraten korrelieren (54 % versus 19 %, $p= 0,047$)¹⁴². Neben der Anzahl der Chemotherapie-Zyklen ist ebenso grundsätzlich das Intervall zwischen der letzten Chemotherapie-Infusion und der Operation entscheidend, um einerseits postoperative Komplikationen aufgrund der Chemotherapie-induzierten Hepatotoxizität zu verringern und andererseits die Gefahr einer Tumorprogression zu vermeiden⁷⁹. Basierend auf diversen Studien⁷⁹ wird ein Intervall von fünf Wochen als optimal angesehen und empfohlen^{111,158,159}.

Eine systematische Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2017, die kumulativ 788 Patienten mit KRLM aus acht Behandlungszentren einschloss, konnte zeigen, dass eine Therapie mit Oxaliplatin sowohl mit dem Auftreten einer schweren („severe“) sinusoidalen Dilatation assoziiert ist (OR: 2,74, 1,67 bis 4,49, $p< 0,001$), als auch mit fortgeschrittenen postoperativen Komplikationen korreliert (Dindo-Clavien Klassifikation III bis V, $p< 0.001$)¹⁶⁰. Zusammenfassend spricht die aktuelle Studienlage für eine Korrelation eines Oxaliplatin-induzierten SOS und damit verbundenen postoperativen Komplikationen.

Die sichere Anwendung von Bevacizumab mit diversen vorteilhaften onkologischen Indikationen scheint in Anbetracht des Oxaliplatin-induzierten SOS interessanterweise eine protektive Wirkung auf die Entwicklung des SOS zu haben. Im Jahr 2007 veröffentlichten Ribero et al. eine retrospektive Studie, in der 105 Patienten mit KRLM eine neoadjuvante Chemotherapie mit 5-FU und Oxaliplatin sowie im Vergleich mit und ohne Bevacizumab erhielten und bei der Kombination mit Bevacizumab eine geringere Inzidenz des SOS aufzeigen konnten (27,4 % versus 53,5 %, $p< 0,01$) sowie gleichzeitig die pathologische Ansprechraten verbesserten¹²⁴. Dieser protektive Effekt konnte in darauffolgenden Studien mehrfach bestätigt

werden. Rubbia-Brandt et al. veröffentlichten eine vergleichbare Studie mit 385 Patienten mit einer Inzidenz fortgeschrittener SOS-Ausprägungen (nach Klassifikation: „moderate“ und „severe“) bei zusätzlicher Gabe von Bevacizumab zur Oxaliplatin-basierten Chemotherapie von 31,4 % (n= 70) im Vergleich zu 62,2 % (n= 204) ohne zusätzlicher Antikörper-Therapie¹⁴⁴. Eine systematische Metaanalyse aus dem Jahr 2016, in der 18 Studien mit insgesamt 2.430 Patienten eingeschlossen wurden, konnte zeigen, dass Bevacizumab bei einer maximalen Anzahl von sechs Behandlungen zusätzlich zu der neoadjuvanten Chemotherapie (> 76 % Oxaliplatin basierte Regime) signifikant sowohl die Inzidenz des SOS (OR: 0,50; p< 0,001) als auch der hepatischen Fibrose (Odds Ratio 0,61; p< 0,001) reduzierte¹²⁰. Jedoch hat die Studie auch bei Bevacizumab-basierten chemotherapeutischen Behandlungen eine signifikant höhere Rate an postoperativen Wundkomplikationen aufgezeigt (OR: 1,81; p= 0,02). Dennoch ist auf Grundlage diverser Studienergebnisse insgesamt von einer sicheren Anwendung ohne erhöhte postoperative Komplikationen zu sprechen, solange zwischen der letzten chemotherapeutischen Behandlung und der Operation ein Intervall zwischen fünf und acht Wochen besteht^{111,161,162}. Diese Daten sind vergleichbar zu den Empfehlungen ohne zusätzlicher Behandlung mit Bevacizumab von ca. fünf Wochen⁷⁹. Hierbei spielt die Leberregeneration eine entscheidende Rolle, da diese möglichst nicht durch die Chemotherapie beeinträchtigt werden darf. Auch in diesem Kontext konnten Studien darlegen, dass Bevacizumab keinen negativen Einfluss auf die Leberregeneration des verbleibenden Gewebes nach Resektion hat¹⁶³⁻¹⁶⁶.

1.4.4 Pathophysiologie des Sinusoidalen Obstruktionssyndroms

Im Hinblick des pathophysiologischen Verständnisses wurden, wie bereits beschrieben, im Jahr 1920 in Südafrika die ersten klinischen sowie auch experimentellen Untersuchungen zu dem SOS durchgeführt¹⁴⁶. Diese Erkenntnisse konnten 1950 in vergleichbaren Untersuchungen in Jamaika bestätigt werden und das Krankheitsbild auf dieser Grundlage erstmals als „Venöse okklusive Leberkrankheit“ definiert werden, die durch pflanzliche Pyrrolizidinalkaloide induziert wird und histopathologisch durch zentrilobuläre Veränderungen im Bereich der Zentralvene charakterisiert ist^{167,168}. Alkaloide bestehen aus mindestens zwei verschiedenen, ringförmig aufgebauten Molekülen, die Stickstoffatome enthalten und durch ein freies Elektronenpaar basisch reagieren. Pyrrolizidinalkaloide sind

sekundäre Pflanzenstoffe, das heißt spezifische, nicht vital notwendige Stoffwechselprodukte, die primär der Abwehr von Pathogenen dienen und daher toxische, insbesondere kardio- und hepatotoxische Wirkungen erzielen¹⁶⁹. Es wurden bereits im Jahr 1906 Pyrrolizidinalkaloide-induzierte Leberschädigungen bei Rindern beschrieben¹⁷⁰. Nach den beschriebenen klinischen Beobachtungen des SOS als Komplikation nach myeloablativer Stammzelltransplantation wurden neben den genannten klinischen histopathologischen Studien diverse experimentelle in-vitro sowie in-vivo Studien publiziert, die jedoch bisher kein reproduzierbares Modell für systematische Analysen der pathophysiologischen Entwicklung ermöglichen¹⁷¹⁻¹⁷⁶.

De Leve et al. ist es 1999 erstmalig gelungen ein Rattenmodell zu etablieren, in dem durch eine einmalige Gabe des aus der Pflanze „*Crotalaria spectabilis*“ stammenden Pyrrolizidinalkaloids „Monocrotalin“ (dessen toxische Wirkung sich erst nach metabolischer Umwandlung in der Leber entfaltet) das SOS in der Leber reproduzierbar in einer konstanten Entwicklung zu induzieren¹⁷⁷. De Leve et al. konnten nachweisen, dass die Pathogenese des SOS initial auf eine Schädigung der durch die Toxine sehr viel empfindlicheren Sinusoidalen Endothelzellen und nicht der Hepatozyten zurückzuführen ist¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Damit ist die bis dahin als „Venöse okklusive Leberkrankheit“ aufgrund der primären vaskulären Pathogenese terminologisch als SOS neu definiert worden^{180,181}.

Basierend auf diesem Modell stellt der erste Schritt der Pathogenese die toxisch-induzierte Schädigung der Sinusoidalen Endothelzellen durch Depolymerisation des Zytoskelett-Strukturproteins F-Actin dar (siehe Abb. 5). Der resultierende Zellstrukturverlust führt zu einem Anschwellen der Sinusoidalen Endothelzellen, so dass sich die Poren des physiologisch diskontinuierlichen Endothelzellenzellverbandes pathologisch erweitern und gleichzeitig eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit am Endothelium zu verzeichnen ist^{178,182}. Folglich strömen auch korpuskuläre Bestandteile des Blutes in den Disse'schen Raum ein und heften sich an die Endothelzellen an, die sich dadurch weiter voneinander, sowie von den Hepatozyten trennen. Diese Barrierschädigung führt zu einem freien Zugang des portalvenösen sowie arteriellen Blutstroms direkt in das Leberparenchym. Gleichzeitig lösen sich die physiologisch im Disse'schen Raum lokalisierten Ito- und Kupferzellen in den Blutstrom hinein, die gemeinsam mit den weiteren korpuskulären

Blutbestandteilen einen Embolus bilden und damit zu einer Obstruktion des Blutflusses führen. Des Weiteren führt die initiale Depolymerisation des F-Actins zu einer erhöhten Expression der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), die sowohl zu einem weiteren Abbau der Extrazellulären Matrix führt, als auch zu einer weiteren Auflösung des Endothelzellverbandes^{178,183}. Neben Oxaliplatin führt auch Monocrotalin zu einem Abbau des Tripeptides Glutathion. Glutathion ist in nahezu allen Körperzellen vorhanden und reduziert als wichtigstes Antioxidans reaktive Sauerstoffverbindungen. Folglich wird in der Pathogenese des SOS der Schutz vor schädigenden freien Radikalen (ROS) herabgesetzt, was unter anderem zu einem vermehrten Zelltod führt^{127,182}.

Im Jahr 2013 ist es Robinson et al. erstmalig gelungen das SOS in einem Mausmodell nach einer fünfwöchigen FOLFOX-Applikation zu induzieren, in der u. a. die pathophysiologische Bedeutung des oxidativen Stresses sowie eines veränderten Gerinnungsstatus anhand einer vermehrten Aktivierung des Gerinnungssystems nachgewiesen wurde¹⁸⁴. Trotz einer geringen Fallzahl ist diese Arbeit von entscheidender Bedeutung, da anstelle von Monocrotalin das SOS erstmalig in einem reproduzierbaren Oxaliplatin-basierten Chemotherapie Modell induziert worden ist, was einen wesentlichen Fortschritt im Hinblick auf eine klinische Translation bedeutet. Darüber hinaus konnten Robinson et al. in dem Modell eine erhöhte Expression von VEGF im Blutserum nachweisen, was aus mehreren Gründen eine relevante Erkenntnis darstellt. Zunächst induziert VEGF die Expression von MMP-9, die, wie beschrieben, in der Pathogenese eine zentrale Rolle einnimmt¹⁸⁵. Des Weiteren haben bereits zuvor tierexperimentelle sowie klinische Studien eine erhöhte Konzentration von VEGF, Endothelin-1 und den Plasminogen-Aktivator-1 im Blutserum bei SOS nachgewiesen^{180,186-188}. Endothelin-1 vermittelt u. a. eine Konstriktion der Sinusoidalen Endothelzellen und trägt so über einen erhöhten Strömungswiderstand zu der Obstruktion des Blutflusses bei. Die weitere Rolle von wichtigen inflammatorischen Molekülen in der Leber, wie der Hepatozytenwachstumsfaktor HGF (hepatocyte growth factor), Interleukin 6 und 10 (IL-6, IL-10) sind dagegen weiterhin wenig bekannt.

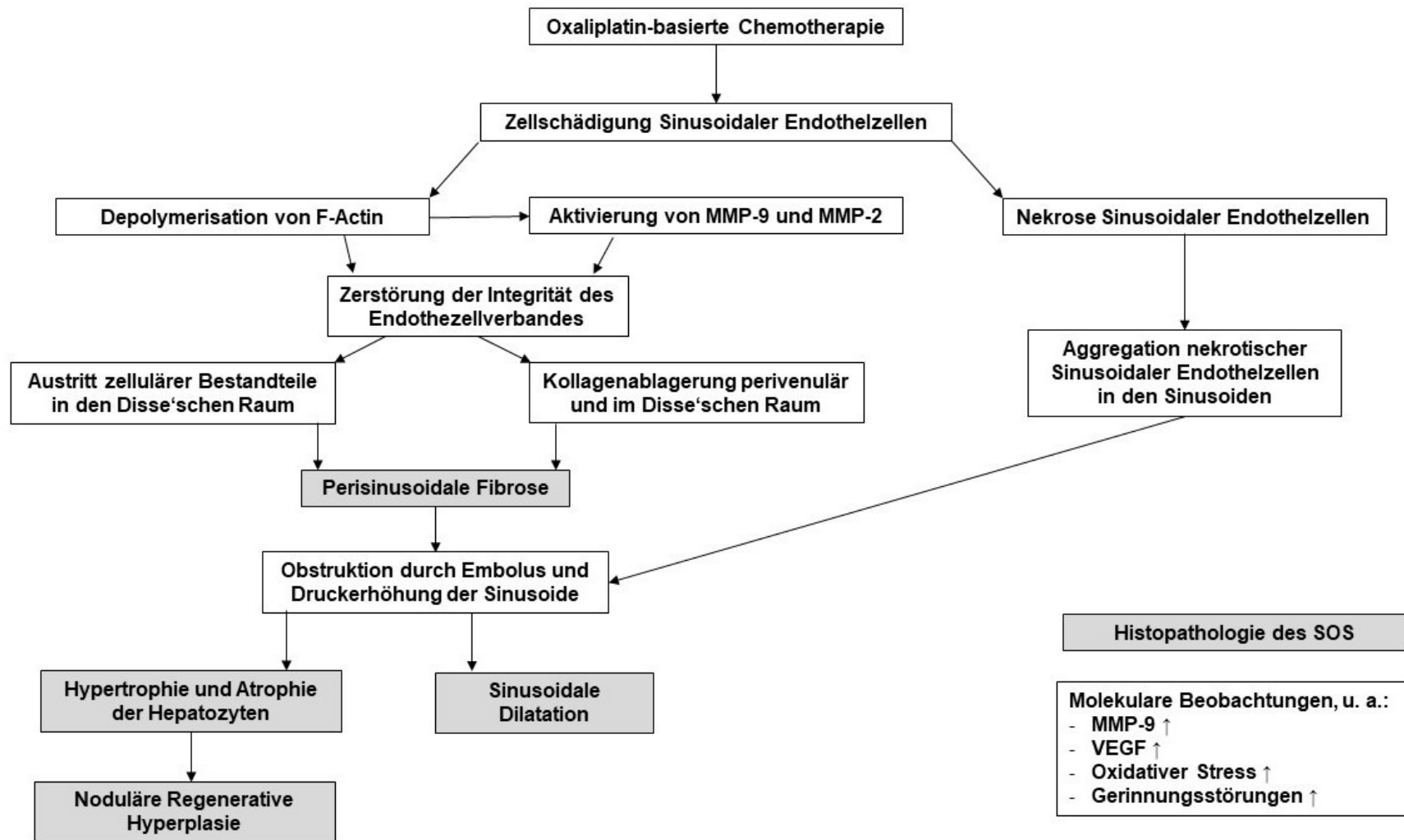


Abbildung 5: Pathophysiologische Abläufe der Entwicklung des Chemotherapie-induzierten Sinusoidalen Obstruktionssyndroms nach You A.H. et al.¹⁸⁹

Die Rolle von VEGF ist in Anbetracht der in klinischen Studien gezeigten protektiven Wirkung von Bevacizumab auf die Inzidenz des SOS von besonderer Bedeutung, da die pathophysiologischen Zusammenhänge weitestgehend ungeklärt sind¹²⁴. Nicht nur im Tiermodell von Robinson et al., sondern auch bei Patienten nach myeloablativer Stammzelltransplantation konnten erhöhte VEGF Konzentrationen im Blutserum nachgewiesen werden¹⁸⁸. Nakamura et al. haben in einer Arbeit Ratten vor der Gabe von MCT zur Induktion des SOS mit dem Proteinkinase-Inhibitor Sorafenib behandelt, der u. a. die VEGF-Rezeptoren 2 und 3 blockiert und im Vergleich zu Kontrollgruppen sowohl die Ausprägung des SOS signifikant reduzieren konnte, als auch das Gesamtüberleben nach Leberteilresektion¹⁹⁰. Die mit Sorafenib behandelten Tiere zeigten ebenfalls eine geringere MMP-9 Aktivität auf, die zu dem Abbau der Extrazellulären Matrix führt, als auch über die Auflösung des Endothelzellenzellverbandes eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des SOS einnimmt^{178,183}. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ratten nach Leberteilresektion und MCT-induzierten SOS eine eingeschränkte Leberregeneration aufwiesen¹⁹¹. Aufgrund der mangelnden Studienlage kann jedoch nicht kohärent erklärt werden, über welche molekularbiologischen Interaktionen das Signalmolekül VEGF, beispielweise bezüglich der Gefäßpermeabilität, Neovaskularisation oder des Gerinnungssystems und dessen medikamentöse Blockierung auf die Pathogenese des SOS hat sowie auf die Leberregeneration.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf der aktuellen Studienlage lassen sich zusammenfassend folgende Vorteile einer neoadjuvanten Chemotherapie bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen darlegen^{125,192,193}: (1.) für Patienten mit initial nicht resektablen Metastasen besteht die Möglichkeit der Konversion in einen resektablen Status. Damit wird mehr Patienten die Chance auf eine Resektion und so der einzigen kurativen Therapie gegeben; (2.) bei Patienten mit initial resektablen Metastasen erhöht sich die Chance auf eine R0-Resektion und so eines verlängerten Langzeitüberlebens; (3.) es können sowohl radiologische als auch pathologische Ansprechraten evaluiert werden, um damit (3.1.) Patienten mit guten Ansprechraten für eine optimale adjuvante Chemotherapie zu identifizieren und das optimale therapeutische Regime zu bestimmen, sowie (3.2.) insbesondere bei schlechtem Ansprechen oder sogar einer Progression unter der Therapie Patienten zu identifizieren, die möglicherweise nicht von einer Resektion profitieren würden und damit die Operation vermieden werden kann.

Jedoch ist die präoperative Behandlung mit Oxaliplatin-basierten Chemotherapieregimen mit einer erhöhten Rate des SOS assoziiert und folglich mit einem verschlechterten intra- sowie postoperativen Verlauf, insbesondere durch eine eingeschränkte Leberregeneration, einhergehend. Darüber hinaus konnte die neoadjuvante Chemotherapie mit der zusätzlichen Therapie des monoklonalem VEGF-AK Bevacizumab weiter optimiert werden, der in diversen Studien unter anderem (1.) zu einem verlängerten progressionsfreien Überleben führte, (2.) das radiologische und pathologische Ansprechen verbessern konnte, (3.) höhere R0-Resektionsraten aufzeigte, sowie (4.) einen protektiven Effekt auf die Entwicklung des SOS zu haben scheint.

Die pathophysiologischen Mechanismen des Oxaliplatin-induzierten SOS sind bisher jedoch nur unzureichend geklärt, ebenso dessen eindeutige Kausalität, da hierzu kein optimales Tiermodell für klinisch translationale Forschungsvorhaben bekannt ist. Des Weiteren ist unklar, ob und auf welcher Weise die Blockade des VEGF-Rezeptors die Entstehung des SOS reduzieren kann und damit die Leberfunktion- und regeneration beeinflusst.

In Anbetracht dessen, dass eine optimierte neoadjuvante Chemotherapie durch Reduzierung der Chemotherapie-induzierten Hepatotoxizität eine hohe klinische Bedeutung für Patienten mit KRLM hat, um so die einzige kurative Therapieoption einer Leberteilresektion zu ermöglichen (neben einer ebenso verbesserten palliativen chemotherapeutischen Behandlung), ergeben sich aus dem aktuellen Wissensstand in dem vorliegenden Forschungsvorhaben folgende Zielsetzungen und Fragestellungen:

1. Entwicklung eines Modells des Oxaliplatin-induzierten SOS und anschließender Leberteilresektion in der Maus zur Bearbeitung klinisch-experimenteller Fragestellungen: Dosisfindungsstudien (Oxaliplatin und VEGF-AK) und perioperative Optimierung.
2. Sind in den Etablierungsversuchen bereits erste Zusammenhänge zwischen der Entwicklung des SOS, der Leberfunktion- und Regeneration sowie dem Einfluss einer zusätzlichen Behandlung mit einem VEGF-AK auf die Entwicklung des SOS zu erkennen?
3. Können in den Etablierungsversuchen anhand der Expression von VEGF-A, VEGFR-1 und VEGFR-2 in der Leber, sowie von VEGF, MMP-9, HGF, Il-6, Il-10, Serpin E1 sowie TIMP-1 im Blutserum bereits pathophysiologische Zusammenhänge in der Entwicklung des SOS dargestellt werden?
4. Lässt sich in einer größeren Kohorte ein Zusammenhang zwischen der Dosis von Oxaliplatin und dem histopathologischen Auftreten von SOS darstellen und zeigt die zusätzliche Behandlung mit einem VEGF-AK eine protektive Wirkung auf die Entwicklung des SOS?

Ein besseres Verständnis über die Entstehung und damit neue Ansätze der Prävention des SOS können langfristig zu einer Optimierung der perioperativen Chemotherapie sowie so zu einer Verbesserung der postoperativen- und Langzeitergebnisse von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen führen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Geräte	Hersteller
Analysewaage Sartorius Entris	Sartorius (Göttingen)
Anlage zur Herstellung von Aqua bidest.	Millipore (Bedford, USA)
Autoklav Laboklav ECO	SHP Steriltechnik AG (Detzel)
Blockthermostate, digital	Avantor - VWR International (Radnor, USA)
Digitalmikroskop	Keyence (Osaka, Japan)
Finnpipette F1 Mehrkanalpipetten	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Heraeus™ Fresco 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Heraeus™ Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Inverses Lichtmikroskop "Axio Observer"	Carl Zeiss (Oberkochen)
Isofluran-Verdampfer	Eickemeyer® Isofluran-Verdampfer TEC 3 (Tuttlingen)
Kühlschrank (-20°C, +4°C)	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Lagertank für flüssigen Stickstoff	Teclab GmbH (Königstein)
Mikroliterpipetten Transferpette® S	Brand GmH & Co KG (Wertheim)
Miniwippe-Schüttler MR-1	Biosan (Riga, Lettland)
Multiparameter-Labormessgerät inoLab Multi 9310 IDS	Xylem Analytics - WTW (Weilheim)
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Operationsmikroskop	Leica Biosystems (Wetzlar)
OP-Lichtmikroskop (M651™)	Leica Microsystems (Wetzlar)
Paraffinausgießstation Leica EG 1160	Leica Biosystems (Wetzlar)
Pipette Research® (Einkanal), diverse Füllmengen	Eppendorf (Hamburg)
Rotationsmikrotom Leica RM2255	Leica Biosystems (Wetzlar)
Schermaschine	Aesculap Schermaschine Exacta GT416 (Tuttlingen)
Schwingmühle MM 400	Retsch GmbH (Düsseldorf)
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tiefkühlschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ultraturrax T10	IKA (Staufen)
Veriti® 96-Well Fast Thermal Cycler	Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Vortex Mixer 7-2020	Neolab (Heidelberg)
Zentrifuge 5430R	Eppendorf (Hamburg)

Tabelle 1: Hersteller der verwendeten Geräte

Labormaterialien	Hersteller
Aquatex® (Aqueous Mounting Agent)	Merck (Darmstadt)
BD Discardit II Spritzen, diverse Größen	Becton Dickinson Company (Franklin Lakes, USA)
Bechergläser, unterschiedliche Füllmengen	B. Braun (Melsungen)
Biosphere® Filter Tips	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Collection Tubes (2 ml)	Macherey-Nagel (Düren)
Dako Pen	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
Deckgläser mikroskopisch	R. Langenbrick GmbH (Emmendingen)
Einbettkassetten mit Deckel	Simport Scientific (Kanada)
Einmalhandschuhe, Latex, gepudert	B. Braun (Melsungen)
Einmalspritzen (1 ml)	B. Braun (Melsungen)
Einwegpipetten, steril	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Eppendorf™ Röhrchen	Eppendorf (Hamburg)
Gefrierbox	Carl Roth (Karlsruhe)
Gewebekleber	3M Vetbond® (3M Aimal Care Products, USA)
Glasküvetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Klemmchen, atraumatisch	B. Braun Aesculap (Tuttlingen)
MicroAmp® Optical Adhesive Film Kit	Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0,1 ml	Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mullkompressen	B. Braun (Melsungen)
Nadelhalter	B. Braun Aesculap (Tuttlingen)
Nadelhalter, fein	B. Braun Aesculap (Tuttlingen)
Nahtmaterial (4-0 Vicryl, 5-0 Seide, 6-0 Prolene)	Johnson & Johnson International (New Brunswick, USA)
Netrifugenröhrchen Nalgene®	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Objektträgerhalter	Carl Roth (Karlsruhe)
OP-Tücher	B. Braun (Melsungen)
Pinzette, chirurgisch	B. Braun (Melsungen)
Pinzette, fein	B. Braun Aesculap (Tuttlingen)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Reagenzröhrchen Blutserum	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht)
Retraktor	B. Braun Aesculap (Tuttlingen)
RNAse freie Plastik-Tubes 1,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
SafeSeal-Tips Professional Filterspitzen, steril	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Schere, fein	B. Braun Aesculap (Tuttlingen)
Schere, groß, abgerundet	B. Braun Aesculap (Tuttlingen)
Schere, klein, abgerundet	B. Braun Aesculap (Tuttlingen)
Sterican® Einmalkanülen (24 G, 27 G)	B. Braun (Melsungen)
Zentrifugenröhrchen Falcon® 15 ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 2: Hersteller der verwendeten Labormaterialien

Chemikalien	Hersteller
0,1 M NaOH	Baker (Mumbai, Indien)
30 % H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich Lot SZBE0710V
5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU)	Roche Diagnostics (Penzberg)
70 % Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Alkoholisches Hautdesinfektionsmittel Softasept® N	B. Braun (Melsungen)
Aquatex® (Aqueous Mounting Agent)	Merck (Darmstadt)
Destilliertes Wasser	Merck (Darmstadt)
Eindeckmittel	Eukitt von Fluka (Deutschland)
Eosin, alkoholisch	Morphisto (Deutschland)
EtOH 50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 %	Avantor - VWR International (Radnor, USA)
Formalin 5 % (Phosphat-gepuffert)	Carl Roth (Karlsruhe)
Hämatoxylin nach Mayer	Appllichem (Deutschland)
Kaisers Glyceringelatine	Merck (Darmstadt)
KCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NaCl 0,9 %	Merck (Darmstadt), B. Braun (Melsungen)
NaOH	Carl Roth (Karlsruhe)
Nuklease-freies Wasser	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Paraffin	Merck (Darmstadt)
RNAse Zap™	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Stickstoff, flüssig	Linde (Pullach)
Tier Gewebekleber 3M™ Vetbond™	3M (Saint Paul, USA)
Xylol	J.T. Baker (Phillipsburg, USA)

Tabelle 3: Hersteller der verwendeten Chemikalien

Medikamente	Hersteller
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer (Leverkusen)
Bupivacain	Sintetica (Mendrisio, Schweiz)
Carprofen (Rimadyl®)	Pfizer (New York City, USA)
Heparin-Natrium-5000-Ratiopharm®	Ratiopharm (Ulm)
Isofluran	Baxter (Deerfield, USA)
Ketamin (Narkosegemisch)	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG (Garbsen)
LEAF™ Purified anti-mouse VEGF-A	BioLegend (San Diego, USA)
Metamizol	Zentiva (Prag, Tschechien)
Oxaliplatin (Eloxatin®)	Sanofi (Paris, Frankreich)

Tabelle 4: Hersteller der verwendeten Medikamente

Software	Hersteller
Microsoft: Word, Excel, PowerPoint	Microsoft (Redmond, USA)
SPSS 13.0	SPSS Inc. (Chicago, USA)

Tabelle 5: Hersteller der verwendeten Software

Verbrauchsmaterialien (-Kits)	Hersteller
Cell Lysis Buffer 2	R&D Systems (McKinley Place NE, USA)
Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
Dako REAL Target Retrieval Solution (10x), pH 6,0	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
Dako Streptavidin-HRP	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
dNTP Mix	Promega (Mannheim)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 1000 reactions	Applied Biosystems™ Foster Cuty (USA)
Magnetic Luminex® Assay Mice Premixed Multi-Analyte Kit	R&D Systems (McKinley Place NE, USA)
MAGPIX® System Calibration Kit	Luminex Corporation (Austin, USA)
Primär-Antikörper: Anti-Ki-67	abcam ab16667 (Cambridge, UK)
Primär-Antikörper: BrdU	abcam ab6326 (Cambridge, UK)
Primer-Sonden-Mix	Applied Biosystems™ Foster Cuty (USA)
Protein-Block 3 % Normal Goat Serum	Dako 3 % Normal Goat Serum
Reverse Transcription Buffer	Promega (Mannheim)
RNase Inhibitor (RNAsin)	Applied Biosystems™ Foster Cuty (USA)
RT-PCR Grade Water	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Sekundär-Antikörper: Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	abcam ab6721 (Cambridge, UK)
Streptavidin-PE	DAKO (Hamburg)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems™ Foster Cuty (USA)
TRIzol® Reagent	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Tabelle 6: Hersteller der verwendeten Verbrauchsmaterialien (-Kits)

2.2 Tierversuche

2.2.1 Tierwahl und Tierhaltung

Sämtliche Tierversuche wurden nach Übereinstimmung aller erforderlichen Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes von der zuständigen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin) ordnungsgemäß beantragt und genehmigt, Aktenzeichen TVA G 0053/16 „Untersuchung des Effekts von Bevacizumab auf die Entwicklung des Oxaliplatin-assoziierten SOS sowie auf die Leberfunktion und Leberregeneration nach Leberteilresektion im Mausmodell“ (Leitung: Univ. - Prof. Dr. med. Marcus Bahra). Die operativen Eingriffe wurden ausschließlich von Mitarbeitern durchgeführt, die sich zuvor sowohl entsprechend den gesetzlichen Anforderungen (Art. 23 Abs. 2a RL 2010/63 i.V.m. Anhang V und §16 TierSchVersV i.V.m. Anlage 1 Abschnitt 3) Tierversuchsvorhaben durchzuführen qualifiziert haben, als auch in

einem genehmigten Lehrprojekt, Aktenzeichen L 0265/12 (Leitung: Univ. - Prof. Dr. med. Igor Maximilian Sauer) alle notwendigen experimentellen, chirurgischen und anästhesiologischen Kenntnisse und Fähigkeiten für die Durchführung der Leberteileresektion erworben haben. Die ordnungsgemäße und artgerechte Tierhaltung wurde durch die zuständigen Veterinärmediziner und Tierschutzbeauftragten sowie ausgebildeten Tierpflegern überwacht und durchgeführt. Alle experimentellen Durchführungen in dem Versuch fanden ausschließlich in der Tierhaltung der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin der Charité - Campus Virchow Klinikum statt. Die Versuchstiere wurden unter S2-Bedingungen in Filterkästen (Temperatur +21°C, Luftfeuchtigkeit 60 %), mit einer Tag/Nacht-Zeitschaltung von jeweils 12 Stunden gehalten und nach den Versuchen wieder in den selben Raum gebracht. Die Tiere hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu phytoöstrogenfreiem Futter (Altromin C 1077 Phytoöstrogenfreie Diät für Ratten und Mäuse; Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG) sowie Leitungswasser ad libitum. Es wurden ausschließlich männliche Versuchstiere des Mausstammes C57BL/6J verwendet. Die Tiere entstammten aus zentralen, spezifiziert pathogenfreien (SPF) Zuchtbereichen der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin, die in Anlehnung der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA) Richtlinien untersucht wurden und initial der Unternehmen Charles-River und Janvier entstammen. Nach einer mindestens einwöchigen Phase der Eingewöhnung wurden die Tiere in einem Alter vor mindestens fünf Wochen für die Versuche verwendet.

2.2.2 Experimenteller Plan und Gruppenübersicht

Das Tierversuchsvorhaben beruhte auf zwei Versuchsreihen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die Etablierung des Tiermodells (erste Versuchsreihen) dar. Diese bestand aus 13 einzelnen Versuchsgruppen (siehe Tbl. 7) und dem Ziel, die optimalen Dosierungen von Oxaliplatin und dem VEGF-AK sowie die Anzahl der jeweiligen Applikationen zu bestimmen. Im Sinne des Tierschutzes ((Prinzip der „3R“: Replace (Vermeiden), Reduce (Verringern), Refine (Verbessern)) wurde zunächst mit einer nach der Literatur maximal geringsten Dosierung von Oxaliplatin begonnen und anschließend die Leberpräparate histopathologisch basierend der SOS-Kriterien (siehe Tbl. 4) analysiert^{184,194-196}. Soweit das SOS histologisch nicht diagnostiziert werden konnte, wurden die Dosierungen, sowie auch die Anzahl der Applikationen

schrittweise in weiteren Versuchsgruppen eskaliert, bis das SOS histologisch nachzuweisen war und gleichzeitig die Tiere die Behandlungen gut tolerierten. Die Finalisierungszeitpunkte betragen jeweils 48 Stunden nach der Operation. Nach Festlegung der optimalen Therapieschemata für das Oxaliplatin-induzierte SOS wurde anschließend die optimale Dosierung des VEGF-AK untersucht und festgelegt. Nach Abschluss der ersten Versuchsreihe (Etablierung) wurde die zweite Versuchsreihe mit dem Ziel durchgeführt, den potenziellen protektiven Effekt eines VEGF-AK auf die Entwicklung und Nebenwirkungen des SOS in einer großen Kohorte zu untersuchen. Basierend der Etablierungsarbeit gliedert sich die zweite Versuchsreihe in fünf Behandlungsgruppen (siehe Tbl. 8).

Versuchsgruppe	Tieranzahl	Dauer der Behandlung	Dosis Oxaliplatin (mg/kg KG)	Dosis VEGF-Antikörper (mg/kg KG)	Finalisierungszeitpunkt
1	3	3 Wochen	6 mg	/	48 h
2	3	3 Wochen	8 mg	/	48 h
3	3	3 Wochen	12 mg	/	48 h
4	3	4 Wochen	11 mg	/	48 h
5	3	4 Wochen	12 mg	/	48 h
6	3	5 Wochen	8 mg	/	48 h
7	3	5 Wochen	8 mg	10 mg	48 h
8	3	5 Wochen	10 mg	/	48 h
9	3	5 Wochen	11 mg	/	48 h
10	3	5 Wochen	12 mg	/	48 h
11	3	5 Wochen	11 mg	5 mg	48 h
12	3	5 Wochen	11 mg	10 mg	48 h
13	3	5 Wochen	11 mg	15 mg	48 h

Tabelle 7: Übersicht der Versuchsgruppen der ersten Versuchsreihe, h= Stunden

Neben den bekannten Dosierungsschemata (ausschließlich Oxaliplatin sowie Oxaliplatin mit einem VEGF-AK) wurden drei weitere Kontrollgruppen eingeschlossen. In der ersten wurde untersucht, ob die alleinige Therapie mit dem VEGF-AK morphologische und funktionelle Einflüsse auf die Leber sowie auf deren Regenerationskapazität hat. Die beiden weiteren Kontrollgruppen, die entweder mit

einem Placebo (Glucose 5 %) behandelt und einer anschließenden Leberteilresektion, oder dem Placebo und einer Sham-Operation unterzogen wurden, dienten der Untersuchung der nicht-medikamentösen Einflüsse des Versuches (Applikationen, Narkosen, Leberteilresektion) auf Leberfunktion- und regeneration.

Anschließend wurden die Tiere in allen fünf Gruppen in jeweils vier verschiedene Finalisierungszeitpunkte (24, 36, 48 und 72 Stunden) randomisiert, um die Dynamik der Leberregeneration in der Analytik widerzuspiegeln. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich bezüglich des zweiten Versuchsvorhabens ausschließlich mit den histopathologischen Analysen.

Versuchsgruppe	Tieranzahl	Dauer der Behandlung	Therapie (mg/kg KG)	Operation	Finalisierungszeitpunkt
14	60	5 Wochen	11 mg Oxaliplatin	2/3 - Leberteilresektion	24 h 36 h 48 h 72 h
15	54	5 Wochen	11 mg Oxaliplatin + 10 mg VEGF-AK	2/3 - Leberteilresektion	24 h 36 h 48 h 72 h
16	30	5 Wochen	10 mg VEGF-AK	2/3 - Leberteilresektion	24 h 36 h 48 h 72 h
17	27	5 Wochen	Glucose 5 %	2/3 - Leberteilresektion	24 h 36 h 48 h 72 h
18	25	5 Wochen	Glucose 5 %	Sham-Operation	24 h 36 h 48 h 72 h

Tabelle 8: Übersicht der Versuchsgruppen der zweiten Versuchsreihe, h= Stunden

2.3 Ablauf der Therapeutika-Applikationen

Die intraperitoneale Gabe aller therapeutischen Substanzen wurde ausschließlich in den dafür vorgesehenen S2-Arbeitsräumen der Tierhaltung durchgeführt. Die Therapeutika (Oxaliplatin und VEGF-AK) wurden konstant bei +4°C gelagert und für den Transport, sowie während der Applikationen in abgeschlossenen Transportboxen, auf Eis gelagert. Das Platin-Derivat Oxaliplatin wurde von der Apotheke der Charité - Universitätsmedizin Berlin geliefert und für maximal eine Woche verwendet. Dagegen konnte der VEGF-AK (LEAF™ Purified anti-mouse VEGF-A Antibody, BioLegend, San Diego USA) aufgrund der langen Halbwertszeit

über einen längeren Zeitraum konstant gelagert werden. Nach Aufbau des Arbeitsplatzes wurden die Tiere gewogen sowie die Therapeutika nach Körpergewicht dosiert (siehe Tbl. 9). Oxaliplatin wurde in unterschiedlichen Verdünnungen von der Apotheke geliefert. Hierbei handelte es sich um nicht mehr benötigte Mengen von Patientenanforderungen. Der verwendete VEGF-AK wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml geliefert, so dass zunächst abhängig der zu verabreichenden Dosierungen und des aktuellen Körpergewichtes die korrekte Menge in eine 1 ml Spritze aufgezogen wurde.

Medikament	Oxaliplatin	VEGF-Antikörper
Konzentration der Zubereitung:	1,1 mg/ ml	2 mg/ml
Benötigte Dosierung:	11 mg/kg KG	10 mg/kg KG
Gewicht der Maus:	20 g	20 g
Menge für die Applikation:	0,200 ml	0,100 ml

Tabelle 9: Beispiel der Konzentrationszubereitung; VEGF-Antikörper: LEAF™ Purified anti-mouse VEGF-A Antibody

Anschließend wurden die Tiere für die Injektion von Oxaliplatin mit Hilfe einer Induktionskammer (geschlossene Box mit Anschluss für einen gesteuerten Isofluran-Zugang und Luftzufuhr über Öffnungen im Deckel) über eine 2,5-prozentige Isofluran Zufuhr bei bestehender Raumluftzufuhr, in eine Kurznarkose versetzt. Diese diente dem Schutz der Tiere vor einer erhöhten Komplikationsgefahr bei Anwendung eines Zytostatikums (u. a. durch Abwehrspannungen- und bewegungen und erhöhte intraabdominelle Druckverhältnisse) sowie auch der Arbeitssicherheit im Sinne des Eigenschutzes. Die Applikation des VEGF-AK erfolgte dagegen sicher im wachen Zustand. Für die Applikation wurden die Tiere sicher in einer Hand dorsal-kranial in Trendelenburg-Position gehalten, so dass das Darmkonvolut nach kranial fiel. Die Applikation erfolgte rechtsseitig auf Höhe des Hüftgelenks (linksseitig befindet sich das vergleichsweise große Cäcum) in einem flachen Injektionswinkel von ca. 30 Grad. Die korrekte Applikation ließ sich sicher anhand eines kurzzeitigen, kräftigen Widerstands spüren. Anschließend wurde das Tier in den ursprünglichen Käfig gesetzt. Dieses wachte nach nur wenigen Sekunden aus der Narkose auf, was physiologisch mit kurzzeitigen motorischen Auffälligkeiten einhergehen konnte. In den Behandlungsgruppen, die Oxaliplatin sowie auch den VEGF-AK erhielten, wurden die Medikamente an zwei aufeinanderfolgenden Tagen getrennt voneinander appliziert.

2.4 Chirurgische Technik, postoperativer Verlauf und Finalisierungen

2.4.1 Ablauf der Leberteileresektion und perioperatives Anästhesiemanagement

Die Tiere wurden für die Narkoseeinleitung per Inhalationsnarkose in eine Induktionskammer gesetzt, die mit 3,5 % Isofluran sowie zwei Liter Sauerstoff pro Minute (min) durchflutet wurde. Nach drei bis fünf min bestand eine ausreichend tiefe Sedierung, um die Tiere in Narkose zu entnehmen und Ketamin (10 mg/kg KG), Metamizol (200 mg/kg KG) sowie Carprofen (5 mg/kg KG) als weitere Narkose- sowie Analgetika Substanzen jeweils nacheinander sicher subkutan zu injizieren (siehe Tbl. 10). Nach erneuter Isofluran-Inhalation wurde das Abdomen bis über das Xiphoid mit einem Rasierer geschoren und das Tier anschließend in Rückenlage auf eine Polyvinylchlorid Unterlage, die sich wiederum auf einer +30°C bis +35°C warmen Wärmematte befand, mit Pflasterstreifen längs über die Extremitäten fixiert, so dass sich der Kopf sicher in der Narkosemaske befand (siehe Abb. 8). Die Augen wurden durch Auftragen mit einer Wund- und Heilsalbe vor Trockenheit geschützt. Die sichere Anästhesie wurde über eine gesteuerte 1,5 % Isofluran-Inhalationsnarkose (0,5 l/min) sowie unter zusätzlicher Zufuhr von zwei Liter Sauerstoff pro Minute gewährleistet. Während der gesamten Dauer der Operation wurde die Atmung des Tieres beobachtet, um die Inhalation von Isofluran bei Bedarf geringfügig zu adaptieren. Das Abdomen wurde mit 70-prozentigen Ethanol desinfiziert und mit sterilen Kompressen getrocknet. Mit einer Pinzette wurde ein Schmerzreiz an den Schwimmhäuten zwischen den Fußzehen gesetzt (Zwischenzehenreflex), um die sichere Analgesie zu kontrollieren. Alle weiteren Operationsschritte erfolgten in sauberer, jedoch nicht-steriler mikrochirurgischer Technik unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops mit 6 bis 12-facher Vergrößerung und koaxialer Beleuchtung. Alle Wattetupfer, die als schonendes, atraumatisches Operationsinstrument dienten, wurden zuvor in einer warmen Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) getränkt. Die Operationstechnik erfolgte nach der von Higgins und Anderson im Jahr 1931 beschriebenen Methode, die im Verlauf der Jahre an die Maus adaptiert^{197,198} (siehe Abb. 6. und 7.) und wie folgt durchgeführt wurde:

Das Abdomen wurde durch eine mediane Laparotomie vom Processus Xiphoideus bis zur Blase eröffnet. Die Haut und das Peritoneum wurden getrennt voneinander eröffnet. Der Processus Xiphoideus wurde mit einer Klemme vorsichtig nach kranial gezogen und fixiert. Ein Retraktor mit zwei Armen wurde ca. 5 mm unterhalb des

Diaphragmas im abdominellen Situs positioniert. Das Ligamentum Falciforme wurde ca. zwei Drittel der Länge nach bis zur suprahepatischen Vena Cava durchtrennt und die Leber sanft mit Wattestäbchen mobilisiert. Anschließend wurde der mittlere Leberlappen mit 5-0 Seide unterfahren, dreifach ligiert (die erste Ligatur mit einem doppelten Knoten), der Lappen vorsichtig mit einer feinen Schere abgesetzt und der verbleibende Faden vom Knoten durchtrennt. Es folgte analog das Absetzen des linken Leberlappens. Die Resektion beider Lappen entspricht ca. 70 % des gesamten Lebervolumens. Falls es nach Absetzen der Leberlappen zu leichten Blutungen gekommen ist, wurden lokalisierte Blutungsstellen mit einem Wattetupfer kurzfristig mit zartem Druck komprimiert, in seltenen Fällen auch unter Zuhilfenahme eines mikrochirurgischen Kauters. Nach Abschluss der Operation wurde ca. 1 ml Kochsalzlösung subkutan injiziert, um die geringfügigen intraoperativen Blutverluste zu kompensieren. Falls Komplikationen aufgetreten sind, die nicht mit dem Tierschutz vereinbar wären, wie auch nicht mit der wissenschaftlichen Notwendigkeit der Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit des Versuches, wurde die Operation abgebrochen und das Tier durch Ausblutung finalisiert, wobei das Herz punktiert und die Aorta sowie das Zwerchfell durchtrennt wurden. Zu diesen Abbruchkriterien zählten unter anderem: Nicht beherrschbare Blutungen nach Gefäßruptur während der Leberteilresektion, die Durchtrennung anatomisch wichtiger Strukturen (Gallengang, Dünn- oder Dickdarm, Pankreas, Ösophagus) während der Eröffnung des Abdomens, ein hoher Blutverlust, das Auftreten einer Darmischämie, Abflussstörungen in einem verbleibenden Leberlappen durch die benachbarte Ligatur, ein gestörter portalvenöser Abfluss bzw. eine Blutstauung im Darmbereich.

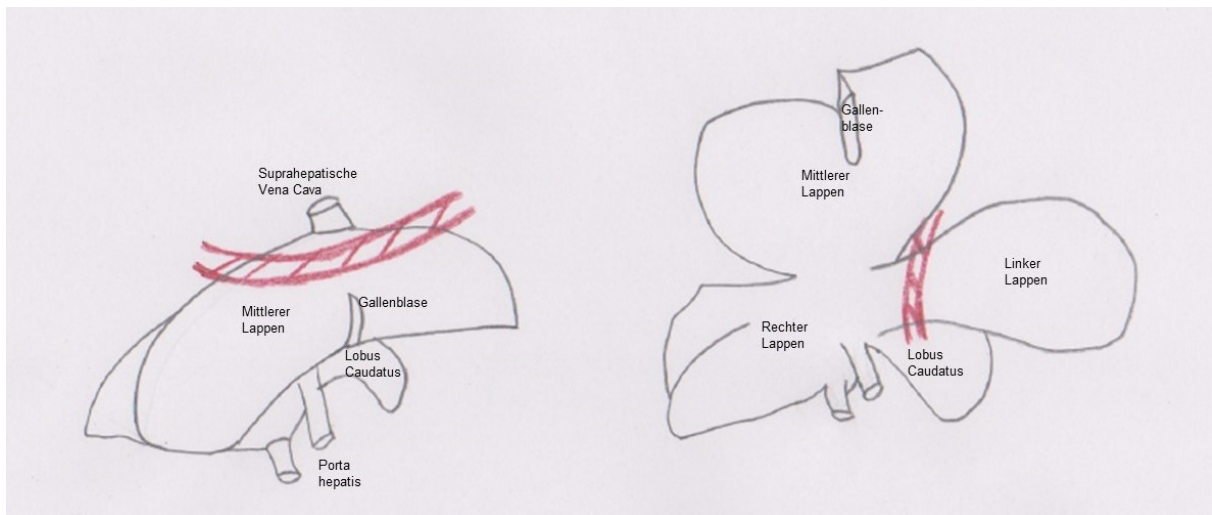


Abbildung 6: Schematische Zeichnung der Anatomie der murinen Leber und die Verläufe der Ligaturen der 2/3-Leberteilresektion nach Mitchell C. et al¹⁹⁹. Zunächst wird der mittlere Lappen wenige Millimeter unterhalb der suprahepatischen Vena Cava abgetrennt. Anschließend erfolgt die Ligatur am medialen Ansatz des linken Lappens (der mittlere Lappen ist zum besseren Verständnis der anatomischen Verhältnisse in der Zeichnung hochgeklappt, jedoch in der OP zuvor, wie beschrieben, durchtrennt).

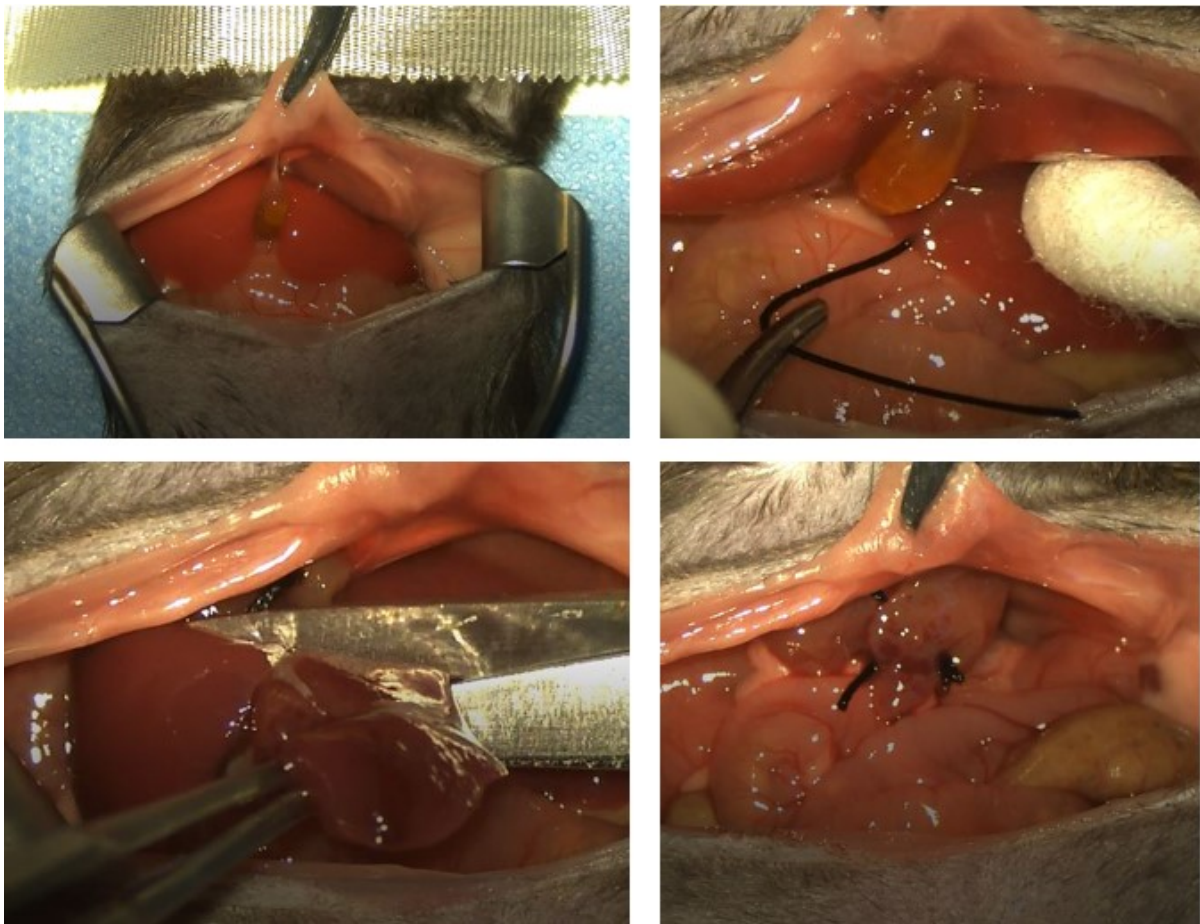


Abbildung 7: Oben links: Situs nach Eröffnung des Peritoneums; oben rechts: Unterfahren des mittleren Leberlappens mit 5-0 Seide; unten links: Durchtrennung des mittleren Leberlappens; unten rechts: Situs nach Absetzen des mittleren und linken Leberlappens

Nachdem beide Lappen entnommen worden sind, wurde der Retraktor und die Klemme am Processus Xiphoideus entfernt. Das Darmkonvolut sowie der Processus Xiphoideus wurden mit je einem Tropfen warmer Kochsalzlösung befeuchtet. Daraufhin wurde das Peritoneum mit 6-0 Prolene in fortlaufender Naht geschlossen und 1 Tropfen Lokalanästhetikum (Bupivacain, Carbostesin® 0,25 %) gleichmäßig auf die Naht verteilt. Es folgte eine fortlaufende Hautnaht mit 4-0 Vicryl, die zum Schutz mit Gewebekleber (3M Vetbond®) versiegelt wurde. Nach der Operation wurden die Tiere (in Seitenlage) für ein bis zwei Stunden in eine Wärmekammer (Temperatur zwischen ca. +20°C und +30°C) gelegt, in der sich bei Flüssigkeits- und Futterbedarf aufgeweichte Futterpellets befanden, um eine postoperative Hypothermie zu reduzieren.



Abbildung 8: Operationsarbeitsplatz (unter dem blauen Abdecktuch befindet sich die elektronische Wärmekammer)

2.4.2 Sham-Operation

Die Tiere der zweiten Versuchsreihe, die sich in der Kontrollgruppe der Sham-Operation („Placebo-Operation“) befanden, wurden lediglich ohne Durchführung der Leberteileresektion dem ansonsten identischen Ablauf der Operation und Anästhesie unterzogen. Da hier keine Leberresektion erfolgte, unterschied sich die Operation ausschließlich durch das Fehlen der Ligaturen und Durchtrennung der Leberlappen. Stattdessen wurde nach Eröffnung des Situs analog zu der durchschnittlichen Zeitdauer der Leberteileresektion gewartet sowie die Leber währenddessen minütlich

vorsichtig mit feuchten Wattestäbchen bewegt. Nach Abschluss der Operation sollte die durchschnittliche Gesamtdauer einer Operation mit Leberteileresektion erreicht worden sein. Die Sham-Operation diene als Kontrollgruppe, um methodisch-bedingte Ergebnisse zu identifizieren, die nicht durch die Hepatektomie, sondern ggf. durch das Inzisionstrauma, der Anästhesie, oder der prä-, intra- bzw. postoperativen Versorgung verursacht worden sind.

2.4.3 Postoperative Kontrollen und Behandlungen

Nachdem die Tiere in der Wärmekammer postoperativ nach gewöhnlich wenigen Minuten aus der Narkose aufgewacht sind (zwischen 5 und 20 min) und diese keine narkosebedingten motorischen Auffälligkeiten mehr aufwiesen, wurden sie zurück in den ursprünglichen Käfig gesetzt. Dieser befand sich daraufhin für weitere ca. zwei bis vier Stunden zur Hälfte auf einer Wärmematte. Eine ausreichende Analgesie wurde während der gesamten postoperativen Phase bis zur Finalisierung durch tägliche subkutane Injektionen von 5 mg/kg Carprofen (ohne kurzzeitige Inhalationsnarkose) sowie der Zuführung von 7 mg/ml Metamizol im Trinkwasser gewährleistet. Des Weiteren wurden angefeuchtete Futterpellets in die Käfige gelegt, um die Nährstoffaufnahme bei möglichen Schmerzen der Hautnaht zu erleichtern. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde in den ersten Stunden nach der Operation engmaschig und anschließend durch tägliche Visiten kontrolliert (Messung des Körpergewichtes, Beurteilung des äußeren Erscheinungsbildes und Verhaltens). Somit konnten unerwartete Verschlechterungen rechtzeitig erkannt und etwaige, notwendige Gegenmaßnahmen getroffen werden (z. B. subkutane Injektion von 1 ml NaCl 0,9 %, vorübergehende Wärme einer Rotlichtlampe) bzw. bei festgelegten Abbruchkriterien das Tier schmerzfrei finalisiert werden. Zu diesen Abbruchkriterien, die in einem standardisierten Bewertungsbogen vorab im Tierversuchsantrag („Score Sheet“) definiert wurden, zählten unter anderem: Paralysen, Apathie, eine laterale Seitenlage sowie ein Gewichtsverlust von > 15 % im Vergleich zum Vortag (24 Stunden).

2.4.4 Finalisierungen

Der Aufbau des Arbeitsplatzes für die Finalisierung erfolgte äquivalent zu dem beschriebenen Aufbau der Leberteilresektion. Eine Stunde vor Hautschnitt erfolgte (äquivalent wie unter „Applikation der Medikamente – Durchführung“ beschrieben) die intraperitoneale Applikation von 50 mg/kg KG 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrDu, Herstellung siehe Kapitel 2.6.5). Die Tiere wurden nach Narkoseeinleitung über das gesamte Abdomen geschoren. Anschließend wurde das Abdomen, ohne separates Eröffnen von Haut- und Peritoneumsnaht, durch Öffnung der Laparotomie-Naht großflächig eröffnet. Es folgte eine makroskopische Beurteilung der intraabdominellen Organe, insbesondere des Leberstumpfes, der Restleber sowie der Milz. Daraufhin erfolgte die Blutentnahme per Herzpunktion mittels Stich durch das Diaphragma in den rechten Ventrikel des Herzens mit einer 1 ml Spritze und 24 G Kanüle (langsame Entnahme, maximal 0,05 bis 0,1 ml pro Zug), in der zuvor 0,1 ml einer Heparinlösung (5.000 Einheiten Heparin auf 20 ml NaCl) aufgezogen wurde, um eine sofortige Koagulation des entnommenen Blutes zu verhindern. Anschließend wurden das Diaphragma sowie die Aorta komplett eröffnet, um den sicheren Tod des Tieres zu gewährleisten. Daraufhin konnten Leberstumpf, der rechte Leberlappen sowie der Lobus caudatus mit einer feinen Schere nacheinander von den umliegenden Strukturen getrennt und entnommen werden. Zum Schluss wurden Milz und Lunge entnommen.

2.5 Probengewinnung

Das Blut wurde nach Entnahme vorsichtig in ein 2 ml Polypropylen-Einmalgefäß (Eppendorf Tubes®) umgefüllt und 10 min bei 3.000 U/min (Umdrehungen pro Minute) und +4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 200 µL Blutplasma vorsichtig in ein Reagenzröhrchen pipettiert, das zunächst bei +4°C gelagert und anschließend für die laborchemischen Messungen zum „Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH“ geschickt wurde. Das restliche Blutplasma wurde in ein 1 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C zur späteren molekularbiologischen Analyse aufbewahrt. Die entnommenen Leberpräparate der Leberteilresektion sowie der Finalisierungen wurden einzeln gewogen und anschließend, nach einem standardisierten Muster, jeder Lappen mit einem Skalpell in vier Präparate geschnitten. Jeweils zwei Präparate wurden in Formalin 5 % (Phosphat-gepuffert) für 48 Stunden bei +4°C in Einbettkassetten

fixiert, während die weiteren 2 Präparate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt wurden (Eppendorf Tubes®). Der Stumpf der Leber wurde ebenfalls gewogen und daraufhin entsorgt. Die Milz wurde gewogen und mit der Lunge getrennt in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um bei -80°C aufbewahrt zu werden.

Überblick der verwendeten Medikamente	
Präoperativ	Isofluran 3,5 % (inhalativ)
	Carprofen s.c. (5 mg/kg KG)
	Metamizol s.c. (200 mg/kg KG)
	Ketamin s.c. (10 mg/kg KG)
Intraoperativ	Isofluran 1,5 % (inhalativ)
Postoperativ	Carprofen s.c. (5 mg/kg KG)
	Metamizol (7 mg/ml, Trinkwasser)
	Isofluran 3,5 % (inhalativ)
Finalisierung	Carprofen s.c. (5 mg/kg KG)
	Metamizol s.c. (200 mg/kg KG)
	Ketamin s.c. (10 mg/kg KG)

Tabelle 10: Überblick der verwendeten Medikamente sowie deren Applikationsformen und Dosierungen

2.6 Histologie und Immunhistochemie

2.6.1 Aufbereitung Formalin-fixierter Präparate

Nachdem die Präparate jeweils in einzelnen Kinetten für mindestens 48 Stunden in Formalin 5 % (Phosphat-gepuffert) bei +4°C fixiert worden sind, wurden diese im ersten Schritt der sogenannten Entwässerung für eine Stunde in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS: „phosphate buffered saline“, pH 7,4; Herstellung: 8,0 g/l NaCl, 0,2 g/l KCL, 1,15 g/l Na₂HPO₄, 0,2 g/l KH₂PO₄) gewaschen. Anschließend wurden die Proben jeweils für zwei Stunden in folgender, aufsteigender Alkoholreihe entwässert: 50 % EtOH, 80 % EtOH, 96 % EtOH, 100 % EtOH. Danach wurden die Proben für drei Stunden in Xylol sowie anschließend für drei Stunden in flüssiges Paraffin gelegt. Alle bisher aufgeführten Vorgänge, mit Ausnahme des Paraffins (Trockenschrank bei +60°C), erfolgten auf einem horizontalen Laborschüttler. Zum Schluss wurden die Proben mit Hilfe einer Paraffinausgussstation in Einbettkassetten mit heißem Paraffin fixiert und auf Eis

getrocknet. Die fertigen Proben („Paraffinblöcke“) wurden anschließend mit einem Rotationsmikrotom in 2 µm dünne Scheiben geschnitten, auf beschichtete Objektträger übertragen und anschließend für eine Stunde bei +60°C getrocknet.

2.6.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die histopathologische Untersuchung (Klassifikation des SOS) basierte auf einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.), auf dessen Grundlage morphologische Veränderungen pathologisch analysiert werden konnten. Der basische Farbstoff Hämatoxylin färbt alle sauren/basophilen Bestandteile (Zellkern, DNA) blau an, während der saure Farbstoff Eosin alle basischen/eosinophilen Strukturen (Zellplasma) rot anfärbt. Für die H.E. Färbung wurden die Paraffinschnitte (2 µm Schnittdicke) zunächst nach folgendem Schema entparaffiniert: Zunächst Xylol für 10 min und anschließend je 5 min in einer absteigenden Alkoholverdünnung (EtOH 100 %, EtOH 96 %, EtOH 80 %, EtOH 70 %, EtOH 50 %). Alle bisherigen Schritte erfolgten jeweils mit Hilfe eines Objektträgerhalters und einer Küvette, so dass der Objektträgerhalter nach jedem Schritt kurz mehrfach abgeklopft werden konnte. Nach der absteigenden Alkoholreihe wurden die Objektträger für 5 min in destillierten Wässern gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 8 min in „Hämatoxylin nach Meyer“ getaucht und direkt im Anschluss für 30 sek unter warmem, fließendem Leitungswasser abgespült und für weitere 2 min in warmem Leitungswasser belassen. Es folgte das Einstellen der Schnitte in der Eosin-Lösung für 30 sek, anschließend wurden die Schnitte für 3 sek in kaltem Leitungswasser geschwenkt. Die nun fertig gefärbten Schnitte wurden abschließend in einer aufsteigenden Alkoholverdünnung (96 % EtOH für 1 min, 100 % EtOH für 2 min) und darauffolgend 2 min in Xylol dehydriert. Die fertigen Schnitte wurden dann mit Hilfe eines Kunstharz-Xylol basierten Eindeckmittels (Eukitt) und einem Deckglas fixiert („eingebettet“) und über Nacht unter einem Abzug getrocknet.

2.6.3 Histopathologische Klassifikation des Sinusoidalen Obstruktionssyndroms

Die histopathologische Analyse für das murine Modell wurde auf Grundlage der nach Rubbia-Brandt et al.¹⁴⁴ etablierten Klassifikation des SOS (von humanen Proben von tumorfreiem Lebergewebe bei Patienten mit KRLM) angepasst, da die bisherige Literatur in Bezug auf eine Chemotherapie-induzierte SOS Charakterisierung bei Ratten- und Mausmodellen als nicht etabliert anzusehen war (siehe Tbl. 11)^{143,144,177,184,190,200}. Dabei wurden die nach Rubbia-Brandt et al.¹⁴⁴ weiteren Merkmale der venösen Läsionen („Centrilobular vein or portal vein lesions“) sowie der Ausprägung der Fibrose nicht untersucht. Die histopathologischen Analysen wurden verblindet von einem Arzt des pathologischen Instituts der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Histologisches Merkmal	Grade der Abstufung
Sinusoidale Dilatation ¹	0, 1, 2, 3
Perisinusoidale Einblutungen	vorhanden, nicht vorhanden
Noduläre Regenerative Hyperplasie ²	0, 1, 2, 3
Steatosis ³	0, 1, 2, 3
Steatohepatitis	vorhanden, nicht vorhanden
Heaptozelluläre Schädigung ⁴	vorhanden, nicht vorhanden

Tabelle 11: Histopathologische Beurteilung des SOS nach Rubbia-Brandt et al. 2010¹⁴⁴

Legende, jeweils zitiert aus Rubbia-Brandt L. et al. 2010:

¹ 0: absent; 1: mild (centrilobular involvement limited to one-third of the lobular area); 2: moderate (centrilobular involvement extending in two-thirds of the lobular area); 3: severe (complete lobular involvement or centrilobular involvement extending to adjacent lobules with bridging congestion)

² 0: absent; 1: mild (focal occasionally distinct nodular hyperplasia on reticulin staining but indistinct on H&E staining); 2: moderate (focal distinct nodular hyperplasia apparent on H&E staining, clearly high-lighted on reticulin staining); 3: severe (diffuse nodular hyperplasia, distinct in most areas on H&E staining)

³: 0: absent; 1: mild (steatosis 10–30 % of the hepatocytes); 2: moderate (steatosis in 30–60 % of the hepatocytes); 3: severe (steatosis in > 60 % of the hepatocytes)

⁴ necrosis, apoptosis, atrophy

2.6.4 Immunhistochemische Färbung: Antigen Ki-67

Die immunhistochemische Färbung mit dem nuklearen Antigen Ki-67 dient als Marker der Zellproliferation und damit der Leberregeneration. Das Antigen wird in allen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2-Phase und Mitose) mit Ausnahme der G0-Phase exprimiert²⁰¹. Das Prinzip der verwendeten Ki-67 Färbung beruht auf einer indirekten Detektionsmethode, der sogenannten LSAB-Methode (Labeled-Streptavidin-Biotin). Dies bedeutet, dass nicht der Primärantikörper selbst, sondern das Ziel-Epitop erst nach Bindung eines Sekundärantikörpers mit einem weiteren enzymatischen Komplex sichtbar wird (Primärantikörper + Sekundärantikörper/ Peroxidase-konjugiertem Streptavidin). Diese Streptavidin-Verbindung wird dann unter Zuhilfenahme einer Substratmischung aus dem Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) und einer Peroxidase farblich sichtbar. Hierzu wurden die Paraffinschnitte (2 µm Schnittdicke) zunächst nach folgendem Schema deparaffinisiert: 35 min Xylol, 2x 5 min EtOH 100 %, 2x5 min EtOH 96 %, 2x5 min EtOH 70 %, 2x2 min PBS. Anschließend folgte die Epitopdemaskierung im Dampfdrucktopf in einer Citratpufferlösung (Dako „REAL Target Retrieval Solution, pH 6,0“) für 10 min in einer dicht verschlossenen Küvette. Diese wurde daraufhin für 10 sek unter fließendem kaltem Wasser und danach auf Eis für 10 min abgekühlt. Nach einem Waschschrift mit PBS für 2x5 min folgte ein Protein-Block (Dako „3 % Normal Goat Serum“) mit einer Inkubationszeit von 20 min, um diffuse unspezifische Hintergrundfärbungen zu reduzieren, die infolge hydrophober und ionischer Interaktion zwischen Primär- und Sekundärantikörpern sowie Gewebekomponenten auftreten können. Nach erneutem Waschen mit PBS für 2x5 min wurde die im Gewebe vorhandene endogene Peroxidase mit einem Peroxidase-Block (DAKO „REAL Peroxidase Solution“) und einer Inkubationszeit von 10 min sowie anschließend erneut mit PBS für 2x5 min gewaschen. Danach wurde der Primärantikörper (abcam Ki-67) in einer 1:500 Verdünnung (Dako „REAL Target Retrieval Solution“) aufgetragen und über Nacht bei +4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für je 5 min wurde der Sekundärantikörper Streptavidin (Dako) für 30 min inkubiert und anschließend für 2x5 min mit PBS gewaschen. Daraufhin folgte die Entwicklung der Farbreaktion mit dem DAB-Chromogen Substrat. Hierzu wurde je ein Tropfen (ca. 20 µl) des DAB Chromogenes (Dako „DAB Chromogen“) in 1 ml des dazugehörigen Substratpuffers (Dako „DAB Substrate“) hinzugefügt. Die Dauer der Reaktion erfolgte nach makroskopischer Sicht

einer Braunfärbung (zwischen 1-5 min). Nach einer ausreichenden Farbreaktion wurde die Reaktion in destilliertem Wasser gestoppt. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung für 5 min mit „Hämatoxylin nach Meyer“. Direkt danach wurden die Proben für 30 sek unter warmem, fließendem Leitungswasser abgespült und für weitere 4 min in warmem Leitungswasser belassen. Zwischen allen hier aufgeführten Schritten wurden die Substanzen durch mehrfaches Abklopfen von den Objektträgern gelöst. Es wurden jeweils 50-100 µl der jeweiligen Färbesubstanzen auf die Objektträger pipettiert bzw. 1-2 Tropfen bei Flaschen mit einem Flaschenaufsatz. Des Weiteren wurden alle Substanzen vor Gebrauch mit Hilfe eines Vortexmischers sorgfältig gemischt. Schließlich wurden die fertigen Präparate in Aquatex® eingedeckt und über Nacht unter einem Abzug getrocknet.

Die Auszählung erfolgte digital mit einer Software des Instituts der Pathologie. Hierfür wurden zunächst bei 200-facher Vergrößerung jeweils fünf Gesichtsfelder eines Präparats des mittleren Lappens sowie des rechten Lappens mit einem Lichtmikroskop (Keyence und Zeiss) digital fotografiert. Anschließend wurden mit Hilfe der Software alle positiven und negativen Hepatozyten gezählt und darauffolgend der Quotient aus der Anzahl aller positiv gefärbten Hepatozyten und aller nicht gefärbten Hepatozyten berechnet.

2.6.5 Immunhistochemische Färbung: 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrDu)

Das Thymidin-Analogon 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrDu) dient als Proliferationsmarker dem Nachweis der Leberzellproliferation. BrDu wird kompetitiv anstelle von Thymidin während der Synthesephase des Zellzyklus in die DNA integriert. Des Weiteren wird bei jeder weiteren Mitose die BrDu-Markierung an die Tochterzelle weitergegeben. Das zu verabreichende BrDu (Sigma Aldrich) wurde bei -20°C gelagert und vor der Injektion in destilliertem Wasser bei einem pH-Wert von 7,4 gelöst (5 mg BrDu/ml). Das korrekte Injektionsvolumen (50 mg/kg KG) wurde, wie bereits beschrieben, eine Stunde vor der Finalisierung der Tiere in Abhängigkeit des Körpergewichts intraperitoneal appliziert (die Menge überschritt mit dieser Konzentration der Zubereitung nicht das maximale intraperitoneale zu verabreichende Volumen von 10 ml/kg in der Maus). Die immunhistochemische Anfärbung erfolgte analog zu der Ki-67 Färbung. Der Primärantikörper (abcam BrDu) wurde in einer 1:200 Verdünnung (Dako „REAL Target Retrieval Solution“)

aufgetragen und ebenfalls über Nacht bei +4°C inkubiert. Die Auszählung erfolgte analog der beschriebenen Technik der Ki-67 Färbungen.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung von RNA

Die Ribonukleinsäure (RNA) Isolierung aus dem Lebergewebe der Leberteilektomie erfolgte unter Verwendung der TRIzol® Reagenz nach Anweisungen des Herstellers. Das Reagenz besteht aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat und erlaubt nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation die getrennte Extrahierung von RNA, DNA und weiteren Proteinen aus einer Probe. Die bei -80°C gelagerten Gewebeproben (ca. 3x4 mm) wurden mit 500 µl gemischt und zu einer homogenen Suspension zerkleinert. Nach fünfminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 0,2 ml Chloroform zugeben, das Gemisch für 15 sek mit der Hand geschüttelt, anschließend für 2 min inkubiert und dann bei 11.500 g (x g Kraft) für 15 min bei +4°C zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen: Eine obere, wässrige Phase (RNA), eine untere, schwere, organische Phase (DNA) sowie dazwischen eine schmale Interphase mit weiteren Proteinfractionen. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues 1,5 ml RNase freies Eppendorf Tubes® umgefüllt und 0,5 ml Isopropanol (2-Propanol) hinzugefügt, das erneut per Hand gründlich gemischt wurde. Diese Mischung inkubierte bei +4°C für 10 min, um dann bei 11.500 g für 15 min bei +4°C zentrifugiert zu werden. Daraufhin bildete sich eine feste RNA Substanz („RNA Pellet“), so dass der Überstand abgenommen werden konnte. Diese „RNA Pellets“ wurden nun mit 500 µl 75 % EtOH gewaschen, das EtOH verworfen und dieser Waschschrift wiederholt. Erneut wurden 500 µl 75-prozentiges EtOH hinzugefügt und bei 7.500 g für 5 min bei +4°C zentrifugiert. Der EtOH-Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das „RNA Pellet“ bei +56°C zwischen 2 bis 5 min getrocknet (das „RNA Pellet“ durfte bei diesem Schritt nicht austrocknen, da sonst die RNA degradiert). Daraufhin wurde 50 µl DEPC-Wasser hinzugefügt und mehrfach mit einer Pipette suspendiert, so dass sich das „RNA Pellet“ vollständig auflöste.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung sowie Bestimmung der Reinheit der RNA, die photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Nanometer) bestimmt wurde (NanoDrop). Als Qualitätskontrolle diente der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm

und 280 nm (280 nm stellt das Absorptionsmaximum von verunreinigten Proteinen dar). Dieser Wert diente als Kontrolle, da er die Reinheit der präparierten RNA bestimmt und sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Eine Absorption von „1“ bei 260 nm entsprach einer Konzentration von 40 µl/mL einzelsträngiger RNA. Falls Proben als verunreinigt (Kontamination durch Proteine oder Phenol) detektiert wurden, konnte diese mit 75 % EtOH gewaschen und erneut gemessen werden. Anschließend wurden alle RNA Proben, die diese Ansprüche erfüllten, nach deren Quantifizierung unmittelbar im Anschluss weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

2.7.2 Reverse Transkription

Als nächstes wurde die isolierte RNA mittels der Reversen Transkriptase in die korrespondierende cDNA (corresponding DNA) umgeschrieben. Falls Messungen nicht direkt im Anschluss der RNA-Isolierung durchgeführt wurden, musste die bei -80°C gelagerte RNA Probe zunächst aufgetaut, sorgfältig mit einem Vortexmischer durchmischt und bei +70°C für 10 min denaturiert werden. Die Reverse Transkription erfolgte mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems) gemäß den Herstellerangaben. Eine detaillierte Beschreibung des Reaktionsansatzes für eine Reaktion kann der nachfolgenden Tabelle 12 entnommen werden. Je nach den angesetzten Reaktionsmengen wurde die verbleibende Menge mit Nuklease-freiem, destilliertem Wasser (DEPC-H₂O) aufgefüllt, um eine Gesamtmenge von 20 µl zu erhalten.

Substanz/ Reagenz	Volumina
RNA	2,00 µl
MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/µL)	1,00 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,80 µl
10x RT Random Primers	2,00 µl
Nuklease-freies, destilliertes Wasser	11,20 µl
10x RT Puffer	2,00 µl
Rnase Inhibitor	1,00 µl

Tabelle 12: Reverse Transkription: Zusammensetzung eines 20 µl Reaktionsansatzes, welches für 2,00 µg RNA und einer Reaktion dient

Die Anlagerung des Primers (siehe Tbl. 13) an den mRNA (messenger RNA) Strang und die dann folgende Reverse Transkription erfolgte bei Inkubation im Thermocycler für zunächst 10 min bei +25°C, anschließend für 120 min bei +37°C und zum

Schluss für 5 min bei +85°C. Die resultierenden cDNA Proben wurden sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C aufbewahrt.

Zielgen	Primer Sequenz (vorwärtslaufend)	Primer Sequenz (rückwärtslaufend)
VEGF-A	5'-CCCCGACGAGATAGAGTA-3'	5'-GCTTTGGTGAGGTTTGAT-3'
VEGF-R1 (Flt1)	5'-CCACCTCTCTATCCGCTGG-3'	5'-ACCAATGTGCTAACCQTCTTATT-3'
VEGF-R2 (KDR)	5'-CAAACCTCAATGTGTCTATTTGC-3'	5'-AGAGTAAAGCCTATCTCGCTGT-3'
b-Actin	5'-CTGAACCCTAAGGCCAAC-3'	5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3'
Ppia	5'-GGCAAATGCTGGACCAAAC-3'	5'-CATTCTGGACCCAAAACG-3'

Tabelle 13: Primer-Sequenzen für die PCR (jeweils für die Spezies Maus)

2.7.3 Echtzeit Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion dient dem Nachweis eines bestimmten DNA-Abschnittes durch gezielte exponentielle Amplifizierung dieser DNA-Fragmente. Die Methode beruht auf drei Einzelschritten, die sich zyklisch wiederholen: (1.) Die Denaturierung des cDNA Doppelstranges in die beiden komplementären Einzelstränge, (2.) die Primerhybridisierung („Annealing“) zur Anlagerung cDNA spezifischer Oligonukleotide („Primer“) an die komplementären Einzelstränge und (3.) die Amplifikation („Elongation“) der markierten Genabschnitte. Hierfür wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit je 9 µl eines Master Mix Ansatzes (siehe Tbl. 14) und anschließend je 1 µl der cDNA pipettiert. Die Platte wurde mit einer adhäsiven Folie bedeckt und dann bei 1.000 U/min für wenige Sekunden zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Messung im Thermozykler (ThermoFisher Scientific).

Substanz/ Reagenz	Volumina
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	5,00 µl
Primer-Sonden-Mix	0,50 µl
Nuklease-freies, destilliertes Wasser	3,50 µl

Tabelle 14: PCR: Zusammensetzung eines 10 µl Reaktionsansatzes, welches für 2,00 µg mRNA dient

Die Denaturierung (Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der DNA) verlief über eine langsame und kontinuierliche Temperaturerhöhung bis +95°C. Nach unmittelbar folgender Abkühlung des Reaktionsgemisches banden sich die spezifischen, komplementären Oligonukleotide („Primer“) jeweils an den Sense-Strang sowie an den komplementären Anti-Sense Strang an, um die Zielregion des Genes spezifisch einzugrenzen. Anschließend erfolgte die

Amplifikation mit der sogenannten Taq-Polymerase, die ursprünglich aus dem Eubakterium *Thermus Aquaticus* (Taq) isoliert wurde und sich durch eine hohe Thermostabilität auszeichnet, sowie mit Nucleotiden und Pufferlösungen (siehe Tbl. 7: „Master-Mix“ Ansatz). Bei einer Temperaturerhöhung auf +72°C synthetisiert diese DNA Polymerase von den ausgehenden 3'-OH-Ende der Primer den neuen Strang vom 5'- zum 3'-Ende. Nach jedem Zyklus verdoppelt sich theoretisch die DNA Menge und ermöglicht so einen selektiven, exponentiellen Anstieg der DNA-Sequenz (nach ca. 30 Zyklen).

Neben den Zielgenen (VEGF-A sowie dessen beiden Ziel-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2) wurden zusätzlich bei jeder Messung die Expression der beiden Haushaltsgene („housekeeping genes“) „b-Actin“ und „Ppia“ gemessen. Diese optimalen endogenen/internen Kontrollen wurden zuvor nach Probemessungen mit diversen Haushaltsgenen bestimmt (u. a. GAPDH, TBP, HPRT). Diese zeichnen sich unabhängig externer Einflüsse (z. B. Medikamente) durch ein relativ konstantes Expressionsniveau aus und dienen als interne Kontrolle der Normierung (als Bezugsgröße) der verwendeten Probe. Beide Haushaltsgene wurden bei jeder Probe zweifach gemessen. Ebenso wurden als Teil der initialen Etablierung Messungen der cDNA von nativen Leberteilresektaten durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Zielgene im gesunden Lebergewebe der Spezies in ausreichender Menge exprimiert werden und messbar sind. Ebenso wurden bei jedem Durchlauf jeweils Negativkontrollen ohne cDNA gemessen.

Die quantitative Messung der Gene erfolgte über den (zusätzlichen) Einbau einer fluoreszenzmarkierten Sonde (Oligonukleotid) an einer spezifischen Sequenz zwischen den beiden Primern eines Zielgenes, die dann von der taq-Polymerase während der Elongation abgebaut wurden. Anschließend wurden die gelösten Nukleotide über eine spezifische Emission des Reporters gemessen. Der gemessene Fluoreszenzfarbstoff nimmt proportional mit der Menge der amplifizierten DNA zu. Die anschließende Analyse erfolgte über den sogenannten „Cycle Threshold“ (CT-Wert), der diejenige Zyklenanzahl beschreibt, bei der das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes erstmalig über der Basislinie der Fluoreszenz erscheint. Die Auswertung der Echtzeit-PCR erfolgte als relative Quantifizierung mit Hilfe der endogenen Kontrollen (Haushaltsgene) mittels der Berechnung nach der $\Delta\Delta CT$ -

Methode. Hierzu werden die Ct-Werte der Zielgene (der Versuchsgruppen sowie der Mittelwert von vier Negativkontrollen, das heißt von unbehandelten Tieren) von den endogenen Kontrollen subtrahiert. Daraufhin wurde der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert als Differenz der beiden Gruppen (Versuchsgruppe und Negativkontrolle) gebildet und der erhaltene Wert in die Gleichung $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt²⁰².

2.8 Untersuchungen des Blutserums

2.8.1 Laborchemische Messungen von Serumparameter

Wie unter 2.4.5. und 2.4.6. beschrieben, wurde das Blut nach Entnahme sofort zentrifugiert und die laborchemischen Messungen des Blutserums anschließend vom „Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH“ durchgeführt. Die Messungen aller aufgeführten Leberfunktionsparameter wurden standardisiert mit klinisch-chemischen Analyseautomaten der Firma Roche/Hitachi durchgeführt.

Die Alanin-Aminotransferase (ALT), auch Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) genannt, gehört zu der Gruppe der Transaminasen, die über den Transfer von Aminogruppen die Umwandlung von Aminosäuren zu den entsprechenden α -Ketosäuren und umgekehrt katalysieren. ALT findet sich neben geringeren Konzentrationen in der Skelettmuskulatur, den Nieren, dem Herzen, der Milz, dem Lungengewebe und dem Pankreas, in höchster Konzentration in der Leber, so dass deren Erhöhungen weitestgehend einen spezifischen Befund für Erkrankungen des Leberparenchyms darstellen. Ebenso gehört die Aspartat-Aminotransferase (AST), auch Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) genannt, zu der Gruppe der Transaminasen und katalysiert durch den Transfer von Aminogruppen die Umwandlung von Aminosäuren zu den entsprechenden α -Ketosäuren und umgekehrt. Zwar ist AST im gesamten Körper weit verbreitet, jedoch sind zellulär ca. 70 % mitochondrial gebunden und 30 % im Zytoplasma gelöst. Daher wird bei schwacher Zellschädigung v. a. der zytoplasmatische Anteil von AST freigesetzt und erst bei schwerwiegenderen Schäden auch mitochondrial gebundene Anteile. Erhöhte AST-Werte können bei Leberzellschädigungen aber auch bei Muskelschädigungen oder einem Myokardinfarkt gemessen werden. Die Messungen von ALT und AST erfolgten jeweils über eine enzymkatalysierte Reaktion, deren Geschwindigkeit indirekt über ein Coenzym (jeweils NADH-Abnahme) photometrisch gemessen wurde und dessen Aktivität direkt proportional zu der ALT- bzw. AST-

Aktivität ist²⁰³. Beide Transaminasen dienen der Beurteilung einer Schädigung des Leberparenchyms, dabei ist ALT als spezifischer für Leberzellschädigungen anzusehen.

Albumin stellt mit einem Anteil von ca. 50-60 % den größten Anteil der Plasmaproteine dar (ebenso im Liquor und Urin). Es dient v. a. der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes und ist das wichtigste Transportprotein für Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit. Da Albumin ausschließlich in der Leber gebildet wird, stellt es einen wichtigen Parameter zur Messung der Leberfunktion dar (weitere Gründe für erniedrigte Werte sind u. a.: Nierenfunktionsstörungen, akute Entzündungen, Hyperhydratation oder Malnutrition). Die laborchemische Messung erfolgt über einen immunologischen Trübungstest, bei dem Anti-Albumin-Antikörper mit dem Antigen der Probe reagieren und nach Agglutination die Bildung der Antigen/Antikörper-Komplexe turbidimetrisch gemessen wird²⁰⁴.

Die Alkalische Phosphatase (AP) kommt in Form von mehreren Isoenzymen vor (in der Leber, Knochen, Dünndarm, Plazenta) und spaltet im alkalischen Milieu Phosphatgruppen zahlreicher Enzyme. Jedoch wird dessen Aktivität beim gesunden Erwachsenen v. a. durch Isoenzyme der Leber und Knochen verursacht, so dass Erhöhungen primär auf hepatobiliäre- und Skeletterkrankungen zurückzuführen sind. Bei Cholestase und hepatobiliären Erkrankungen wird die AP vermehrt an die Zellmembran gebunden und über die Phospholipase D bzw. durch Komplexbindung mit Lipoprotein X (bei Cholestase) in das Blutplasma gelöst. Die laborchemische Messung der Enzymaktivität erfolgte über die photometrische Messung der Extinktionszunahme des freigesetzten p-Nitrophenols (aus p-Nitrophenylphosphat gespalten), das direkt proportional zur katalytischen AP-Aktivität steht. Als weiterer, primärer Marker der Cholestase diente die Messung des Gesamtbilirubins. Bilirubin entsteht beim Abbau aller Häm-haltigen Proteine im retikuloendothelialen System und wird biliär im Darm ausgeschieden. Es dient der Diagnose von Lebererkrankungen, dem Nachweis einer hämolytischen Anämie sowie der Bewertung des Schweregrades eines Ikterus (Gelbsucht). Die Ursachen für eine Erhöhung des Gesamtbilirubins können in drei Kategorien eingeteilt werden: (1.) Prähepatisch aufgrund eines vermehrten Hämoglobinabfalls, (2.) intrahepatisch aufgrund einer gestörten Konjugation des (indirekten) Bilirubins, oder (3.)

posthepatisch aufgrund von Störungen des Gallenabflusses (Cholestase). Das Messprinzip beruht auf der Diazo-Methode (Paul Ehrlich, Charité, 1883), hier vorliegend modifiziert von Wahlefeld et al., in der eine photometrische Bestimmung von Azobilirubin erfolgt, das nach Reaktion von Bilirubin mit einer Diazoniumverbindung entstanden ist^{205,206}.

2.8.2 Proteinbestimmung mittels Luminex Multiplex Assay

Das Luminex® MAGPIX® System (R&D Systems BioTechne) ermöglicht die simultane Analyse von bis zu 50 Analysaten einer einzigen Probe mit definierten Spektralsignaturen und Nachweisgrenzen, die eine deutlich verbesserte Aussagekraft im Vergleich zu Einzelnachweisen mit hoher Sensivität und Spezifität aufweisen²⁰⁷. Die Technologie basiert auf der Mikropartikeldurchflusszytometrie, bei der farbmarkierte Mikropartikel (Polystyrolpartikel), sogenannte "Beads", die mit einem Durchmesser von 2-6 µm als Festphase für verschiedene biochemische Nachweisreaktionen dienen und individuell in Suspensionen („Beadspopulation“) kombiniert werden können²⁰⁸. Jedes dieser einzelnen Beads ist spezifisch über einem roten Fluoreszenzfarbstoff definiert und trägt zusätzlich ein spezifisches Nachweisantigen an der Oberfläche. Es ergeben sich damit nach Inkubation mit den Proben Antikörper-Antigen-Komplexe, dessen Nachweis mittels Zugabe eines Detektionsmoleküls/Konjugat erfolgt (Phycoerythrin-konjugiertes Streptavidin)²⁰⁹. Anschließend erfolgt mittels zwei verschiedenen Lasern die Analyse der Farbcodierung des Antigens (Beads) sowie des darauf gebundenen Phycoerythrin (sekundärer Antikörper)²¹⁰. Da sich der spektrale Bereich der Beads von dem des Konjugat-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes unterscheidet, kann eine getrennte Klassifizierung der Beads und der Quantifizierung der Analysate erfolgen.

Die notwendigen Materialien werden in dem individuell angefertigten "Material-Kit" (R&D Systems BioTechne) bei +4°C gelagert. Alle Proben, Standards und Kontrollen wurden jeweils zweifach pipettiert und gemessen sowie vor dem Anmischen bzw. Pipettieren jeweils für 30 sek bei 1.000 g zentrifugiert und für 10 sek auf einem Vortexmischer durchmischt. Nachdem die Standards rekonstituiert (Verdünnung ist abhängig von der Gesamtanzahl der verschiedenen Analysate), die Proben verdünnt (Calibrator Diluent RD6-52) und Kontrollen (100 % Verdünnungslösung) vorbereitet wurden, konnten diese mit jeweils 50 µl auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Wells

pipettiert werden. Anschließend wurde die gleiche Menge von dem lichtsensitiven Antikörper (ebenfalls zuvor nach Angaben verdünnt) pipettiert und die Platte dann, lichtdicht verschlossen, für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem horizontal-orbital Schüttler inkubiert werden. Darauf folgten drei Waschvorgänge mit dem zuvor hergestellten Waschpuffer für jeweils eine Minute. Hierbei musste die Mikrotiterplatte stets auf einem Magnethalter befestigt werden, da sich die Mikropartikel Beads ansonsten sofort vom Boden der Platte lösen würden. Daraufhin wurden 50 µl des verdünnten „Biotin-Antikörper Cocktails“ pipettiert und bei identischen Bedingungen für eine Stunde inkubiert. Nach einem erneuten, analogen Waschschrift (drei Durchgänge) wurden je 50 µl des angemischten Phycoerythrin-konjugierten Streptavidins hinzugefügt und für 30 min inkubiert. Nachdem dann letzten Waschschrift (von insgesamt drei Durchgängen) wurden je 100 µl des Waschpuffers pipettiert, nach zweiminütiger Inkubationszeit die Mikrotiterplatte in das Luminex® MAGPIX® gelegt und die Messung begonnen. Die Auswertung der Daten der mittleren Intensitäten der Fluoreszenzen erfolgte automatisiert mit Hilfe der Hersteller-Software (xPONENT®). Die Auswertung erfolgte neben einer Eichkurve der Standardreihe, mittels gewichteter „5-Parameter-Logistic“. Zu jeder Messung wurde eine Eichkurve aus den Messreihen der Standardreihe erstellt.

2.9 Relatives Lebergewicht und Milzgewicht

Zur Bestimmung der Leberregeneration nach Leberteilresektion wurde das Gewicht des resezierten Leberanteils (mittlerer und linker Leberlappen) mit dem verbleibenden Stumpf (bei der Finalisierung entnommen) berechnet sowie das Gewicht des Versuchstieres bestimmt. Anschließend konnte der Quotient aus beiden Werten gebildet werden. Nach der Finalisierung wurde das Gewicht der Restleber (rechter Leberlappen und Lobus caudatus) gewogen und der Quotient mit dem vorherigen Wert berechnet. Ebenso wurde der Quotient aus dem Gewicht der Milz mit dem Gesamtgewicht des Tieres zu Operationsbeginn berechnet, um das relative Milzgewicht vergleichen zu können.

2.10 Statistik

Zur statistischen Auswertung und deren graphischer Darstellung wurde die Software SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) angewandt. Aus den Einzelwerten wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung errechnet. Die Varianzanalyse wurde mit dem Levene's Test durchgeführt und die Gruppenunterschiede mit dem t-Test für unabhängige Stichproben überprüft. Ein p-Wert von kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikanter Unterschied akzeptiert.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der optimalen Behandlungsdosis und Therapiedauer anhand der Toleranz der Behandlungen und Induktion des Sinusoidalen Obstruktionssyndroms

Die Gesamtanzahl beider Versuchsreihen betrug 235 Tiere. Die erste Versuchsreihe umfasste 39 Tiere, von denen 26 Tiere (66,66 %) den gesamten Versuchsablauf (Applikationen, Leberteilresektion, Finalisierung) überlebten (siehe Tbl. 15). Die zweite Versuchsreihe beinhaltete 196 Tiere, von denen 111 Tiere (56,63 %) den gesamten Versuchsablauf überlebten (siehe Tbl. 16). Insgesamt sind sechs Mitarbeiter bzw. Doktoranden, die zuvor das obligatorische Lehrprogramm absolviert hatten, an den invasiven Tätigkeiten (Applikationen, Operationen) beteiligt gewesen. Die wöchentlichen Chemotherapie-Applikationen unter Kurznarkose wurden wesentlich vom Verfasser der vorliegenden Dissertation und einem weiteren medizinischen Doktoranden durchgeführt. Der Verfasser hat anteilig 90 von insgesamt 204 Leberteilresektionen sowie 74 von insgesamt 161 Finalisierungen in beiden Versuchsreihen vorgenommen.

Die erste Versuchsreihe wurde im Sinne des Tierschutzes in einem schrittweisen Herangehen in Kohorten mit zunehmender Dosis und Anzahl der Applikationen durchgeführt. Erst nach vollendeter Durchführung der ersten Kohorte (Behandlungsgruppe 1) und deren histopathologischer Auswertung wurde mit der zweiten Kohorte begonnen und nach diesem Schema fortgeföhren (vgl. Tbl. 15). Mit diesem Vorgehen konnte eine geringstmögliche Gesamttieranzahl erreicht werden. In der Tabelle 15 sind die insgesamt sechs Kohorten mit den zunächst wichtigsten Parametern für die Etablierung/Entscheidung des optimalen Behandlungsregimes zusammengefasst. Während bei einer geringen Dosis und einem kurzen Therapiezeitraum der Ausfall an Tieren zwar vergleichsweise gering ausfiel, konnte man jedoch auch keine bzw. nur geringe histopathologische Ausprägungen des SOS induzieren. Je intensiver das Therapieregime gesteigert wurde, desto häufiger und ausgeprägter konnte das SOS induziert werden. Jedoch erhöhte sich aufgrund der Toxizität auch die Mortalität.

Behandlungsgruppen			Körpergewicht				Ausfall			Sinusoidale Dilatation (SOS)	
Kohorte	Versuchsgruppe	Dosierungen/ Applikationsdauer	Gewicht Behandlungsbeginn	Ausgangsgewicht bei OP	Tag 1 post-OP	Tag 2 post-OP	präoperativ	intraoperativ	postoperativ	Grad 1	Grad 2
1	1	Oxaliplatin 6 mg/3w	20,2	22,1	19,2	18,6	0	0	0	1	0
2	2	Oxaliplatin 8 mg/3w	21,1	22,1 **	19,2 **	18,6	1	0	0	0	0
	6	Oxaliplatin 8 mg/5w	20,0	23,0	19,3 *	17,3 *	0	2	0	2	0
3	7	Oxaliplatin 8 mg + VEGF-AK 10 mg/5w	21,0	24	21,6	20,2	0	0	0	0	1
4	8	Oxaliplatin 10 mg/5w	18,7	22,3 **	20,5	20,1	1	0	0	0	1
	10	Oxaliplatin 12 mg/5w	18,0	15,8 *	/	/	2	0	1	1	2
5	3	Oxaliplatin 12 mg/3w	20,6	21,7	19,5	19,1	0	0	0	0	0
	4	Oxaliplatin 11 mg/4w	21,2	23,3 **	21,5	20,2	0	1	0	2	0
	5	Oxaliplatin 12 mg/4w	19,1	20,0 **	15,0 *	15,3 *	1	1	0	1	0
	9	Oxaliplatin 11 mg/5w	19,7	21,6	19,3	18,0	0	0	0	1	1
6	11	Oxaliplatin 11 mg + VEGF-AK 5mg/5w	21,2	18,7	19,2 *	18,3*	0	0	2	2	0
	12	Oxaliplatin 11 mg + VEGF-AK 10 mg/5w	22,0	23,5	22,00	21,9	0	0	1	0	0
	13	Oxaliplatin 11 mg + VEGF-AK 15 mg/5w	22,0	25,0	23,5	22,9	0	0	1	1	0

Tabelle 15: Übersicht der Versuchsgruppen (sortiert nach Kohorten/systematische Reihenfolge) des Vorversuchs, jeweils drei Tiere pro Versuchsgruppe; Ausfall jeweils in absoluten Zahlen; Körpergewicht jeweils arithmetisches Mittel; w= Wochen; *= Wert eines Versuchstieres, **= Mittelwert von zwei Versuchstieren; Grau hinterlegt sind die jeweils optimalen Therapieregime, die final ausgewählt worden sind

In den Versuchsgruppen 1, 2 und 3 mit 6 mg, 8 mg bzw. 12 mg Oxaliplatin und einem Behandlungszeitraum von jeweils 3 Wochen konnten bei nur einem Tier sinusoidale Dilatationen befundet werden (siehe Tbl. 16). Von diesen insgesamt 9 Tieren verstarb nur eines der Tiere präoperativ in der Versuchsgruppe 2 (Dosis 8 mg). Insgesamt war bei einem Behandlungszeitraum von 3 Wochen zwar eine geringe Mortalität zu verzeichnen, jedoch einhergehend auch mit einer geringen Ausprägung des SOS.

Behandlungszeiträume 3, 4 und 5 Wochen: Mortalität und SOS			
Versuchsgruppen	Behandlungszeitraum	Mortalität	Sinusoidale Dilatationen
1, 2, 2	3 Wochen (n= 9)	1 (11 %)	1 (11 %)
4, 5	4 Wochen (n= 6)	2 (33 %)	3 (50 %)
6, 8, 9, 10	5 Wochen (n= 12)	6 (50 %)	8 (66 %)

Tabelle 16: Übersicht der Versuchsgruppen mit Behandlungszeiträumen von 3, 4 und 5 Wochen auf Mortalität und sinusoidale Dilatationen

Die enge therapeutische Breite, das heißt die Balance zwischen dem Ziel der suffizienten Induktion des SOS durch Oxaliplatin und dessen gleichzeitiger Toxizität, wurde besonders in den Behandlungsgruppen 4 und 5 deutlich, mit einem Behandlungszeitraum von jeweils 4 Wochen (in Klammern jeweils arithmetisches Mittel:): Bei einer Dosis von 11 mg stieg das mittlere Gewicht von Behandlungsbeginn (21,1 g) innerhalb der vier Wochen bis zur Operation (23,3 g) an, ein Tier verstarb intraoperativ. Anschließend fiel das Körpergewicht der zwei verbliebenen Tiere moderat bis zur Finalisierung (20,2 g) und beide (verbliebenen) Tiere wiesen im Leberpräparat sinusoidale Dilatationen auf. Dagegen verstarb bei einer Dosis von 12 mg ein Tier bereits in der dritten Behandlungswoche. Das mittlere Gewicht der zwei verbliebenen Tiere stieg zunächst noch geringfügig von Behandlungsbeginn (19,1 g) bis zur Operation (20,0 g). Daraufhin verstarb eines der Tiere intraoperativ und das verbliebene, letzte Tier zeigte zwar sinusoidale Dilatationen auf, verzeichnete allerdings auch eine Gewichtsreduktion von 17,8 g zum Zeitpunkt der Operation auf 15,3 g bei Finalisierung. Zusammenfassend stellte hier eine Dosissteigerung von nur einem Gramm von 11 mg auf 12 mg die Schwelle der Toxizität dar, gekennzeichnet durch einen starken Gewichtsverlust und hoher Mortalität.

Dagegen wiesen alle Tiere aus den Behandlungsgruppen 6, 8, 9 und 10 mit einer Therapiedauer von 5 Wochen, unabhängig der Dosis von Oxaliplatin (zwischen 8 mg

und 12 mg), sinusoidale Dilatationen auf, bei einer gleichzeitig hohen Ausfallrate von 8 Tieren (vgl. Tbl. 16 und Abb. 9). Während eine Dosis von 10 mg zwar nur eine Ausfallquote von einem Tier nach sich zog, jedoch nur ein Tier mit einem pathologischen Befund der Leber einherging, verzeichnete die Versuchsgruppe 10 mit einer Dosis von 12 mg zwar eine Quote sinusoidaler Dilatationen von 100 %, jedoch verstarben alle Versuchstiere dieser Gruppe. Es zeigte sich schließlich eine optimale Dosis von 11 mg bei einem Behandlungszeitraum von 5 Wochen, da es hier zu keinem Ausfall von Versuchstieren kam und gleichzeitig zwei von drei Tieren (66,66 %) ein SOS entwickelten.

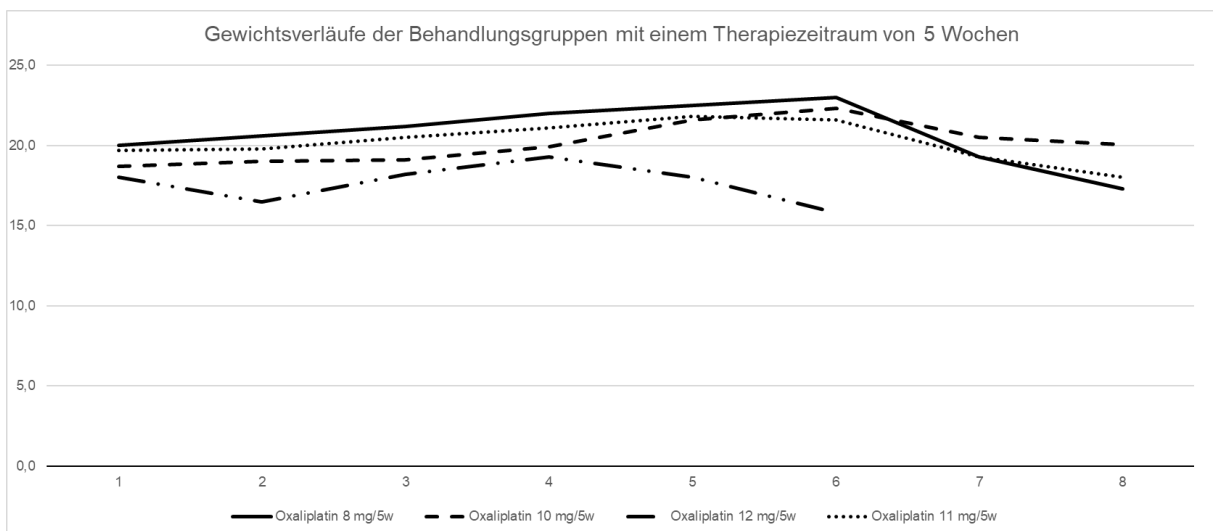


Abbildung 9: Gewichtsverläufe der Versuchsgruppen 6, 8, 9 und 10, jeweils arithmetisches Mittel; Beschriftung der x-Achse: 1-5: jeweils Woche 1-5 der Applikationen, 6: Leberteilresektion, 7: postoperativer Tag 1 (24 h), 8: postoperativer Tag 2/Finalisierung (48 h); Beschriftung y-Achse: Körpergewicht in Gramm; w= Wochen

3.2 Dosisfindung von Oxaliplatin und einem VEGF-Inhibitor im Zusammenhang mit Gewichtsverläufen und Gesamtüberleben

Nach Etablierung der optimalen Dosis sowie Behandlungsdauer von Oxaliplatin zur Induzierung des SOS wurde anschließend die optimale Dosis des zusätzlich zu applizierenden VEGF-AK gesucht, um die Entwicklung des SOS zu reduzieren. Insgesamt 3 Gruppen erhielten neben 11 mg Oxaliplatin am Folgetag jeweils 5 mg, 10 mg bzw. 15 mg des VEGF-AK. Eine Dosis von 5 mg des VEGF-AK (Behandlungsgruppe 11) führte zu einer stärkeren Abnahme des Gewichtes im Vergleich zu den höheren Dosierungen (siehe Abb. 10). Ein Tier aus der Gruppe ist

nach nur einer Stunde postoperativ verstorben, ein weiteres innerhalb der ersten 24 Stunden. Die histopathologische Auswertung der ersten beiden Tiere zeigte jeweils sinusoidale Dilatationen auf (siehe Tbl. 10).

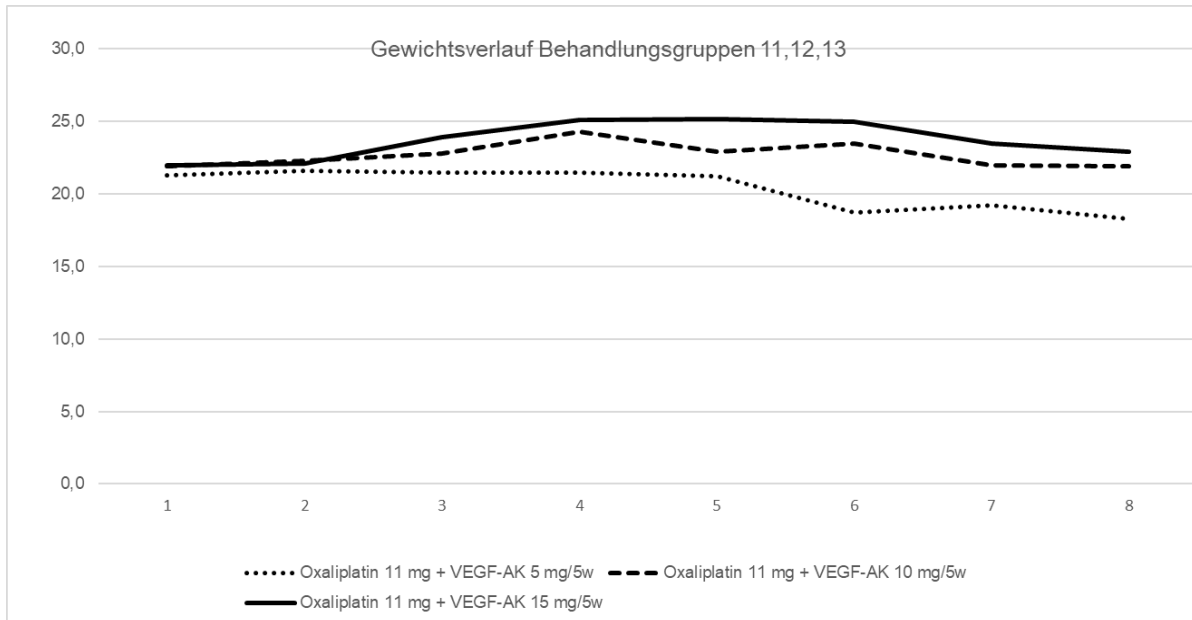


Abbildung 10: Gewichtsverläufe der Versuchsgruppen 11, 12 und 13, jeweils arithmetisches Mittel; Beschriftung der x-Achse: 1-5: jeweils Woche 1-5 der Applikationen, 6: OP (Leberteilresektion), 7: Postoperativer Tag 1 (24 h), 8: Postoperativer Tag 2/ Finalisierung (48 h); Beschriftung y-Achse: Körpergewicht in Gramm; w= Wochen; Gruppe 11 (VEGF-AK 5 mg): jeweils 2 Tiere vor dem ersten postoperativen Tag verstorben. Gruppe 12 (VEGF-AK 10 mg) und 13 (VEGF-AK 15 mg): jeweils 1 Tier nach dem ersten postoperativen Tag verstorben

Im Vergleich dazu verzeichnete die Behandlungsgruppe 13 mit der maximalen Dosis von 15 mg des VEGF-AK eine moderatere postoperative Gewichtsabnahme (vgl. Tbl. 17). Eines der Tiere entwickelte sinusoidale Dilatationen. Die Tiere der Behandlungsgruppe 12, in der 10 mg des VEGF-AK zusätzlich appliziert wurden, zeigten sowohl einen stabilen Gewichtsverlauf als auch keine pathologischen Befunde in der Histologie auf. In den Behandlungsgruppen 12 und 13 verstarb jeweils ein Tier zwischen dem ersten und zweiten postoperativen Tag. Somit verzeichnete die Versuchsgruppe 12 (Oxaliplatin 11 mg + VEGF-AK 10 mg für 5 Wochen) die optimale Behandlungsregime bei einem vertretbaren Ausfall von einem Tier und keinen sinusoidalen Dilatationen in den untersuchten Leberbiopsien.

Versuchsgruppen 11-13	Sinusoidale Dilatation (SOS)	
	Grad 1	Grad 2
Dosierungen/ Applikationsdauer		
Gruppe 11: Oxaliplatin 11 mg + VEGF-AK 5 mg/5w *	2	0
Gruppe 12: Oxaliplatin 11 mg + VEGF-AK 10 mg/5w **	0	0
Gruppe 13: Oxaliplatin 11 mg + VEGF-AK 15 mg/5w **	1	0

Tabelle 17: Histopathologische Ergebnisse der Behandlungsgruppen 11,12,13; w= Wochen; *= Ein Tier hat den gesamten Versuchsablauf überlebt, zwei Tiere wurden ausgewertet (zusätzlich des kurz nach der Operation verstorbenen Tieres, **= Auswertung von jeweils zwei Tieren, da jeweils ein Tier der Gruppen 12 und 13 zwischen dem ersten und zweiten postoperativen Tag verstorben ist

3.3 Histopathologische Analyse des SOS: Dosisfindungsstudie

Die beschriebenen histopathologischen Ergebnisse basierten auf dem histologischen Merkmal der sinusoidalen Dilatation. Die weiteren von Rubbia-Brandt et al. in klinischen Studien definierten Merkmale konnten im murinen Modell nicht suffizient reproduziert werden¹⁴⁴. Es zeigte sich, dass die diversen histopathologischen Merkmale wie hepatozelluläre Schädigungen, perisinusoidale Einblutungen und Steatohepatitis auch in unserem Modell zu diagnostizieren waren (siehe Abb. 11-14). Jedoch haben diese weiteren Merkmale nicht ausreichend genug mit dem Schweregrad der sinusoidalen Dilatation korreliert. Daneben stellte es sich zunächst als herausfordernd dar, die sinusoidalen Dilatationen in Abstufungen zu klassifizieren, wie es bei humanen Proben in den genannten Studien beschrieben wird. Es war jedoch möglich, die sinusoidalen Dilatationen anhand von eindeutigen Befunden aus der eigenen Studie als entsprechende Referenzergebnisse einzustufen, miteinander zu vergleichen und damit repräsentative Ergebnisse zu reproduzieren. Nach Festlegung dieser Vergleichswerte, die in dieser Arbeit etabliert wurden, konnten alle Proben in der ersten sowie auch zweiten Versuchsreihe auf das Vorliegen sowie den Schweregrad der sinusoidalen Dilatationen verblindet von einem Pathologen ausgewertet werden. Das Vorliegen der sinusoidalen Dilatationen stellte, wie auch von Robinson et al beschrieben, das spezifischste Merkmal für das SOS dar¹⁸⁴.

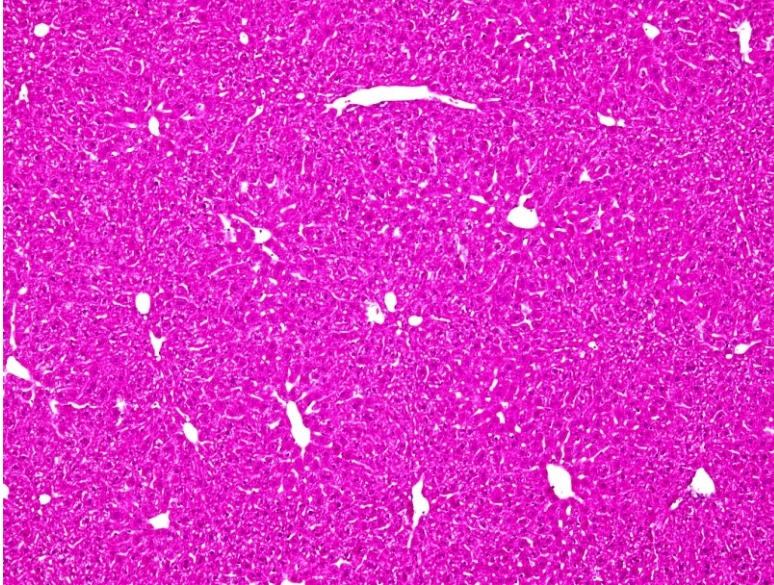


Abbildung 11: Abbildung eines histologisch aufgearbeiteten Leberschnittes (2 μ m Schnittdicke, H.E. Färbung) nach Leberteilresektion aus der Behandlungsgruppe 6 mg/kg KG Oxaliplatin für 3 Wochen, 10-fache Vergrößerung, pathologischer Befund: Keine histopathologischen Veränderungen

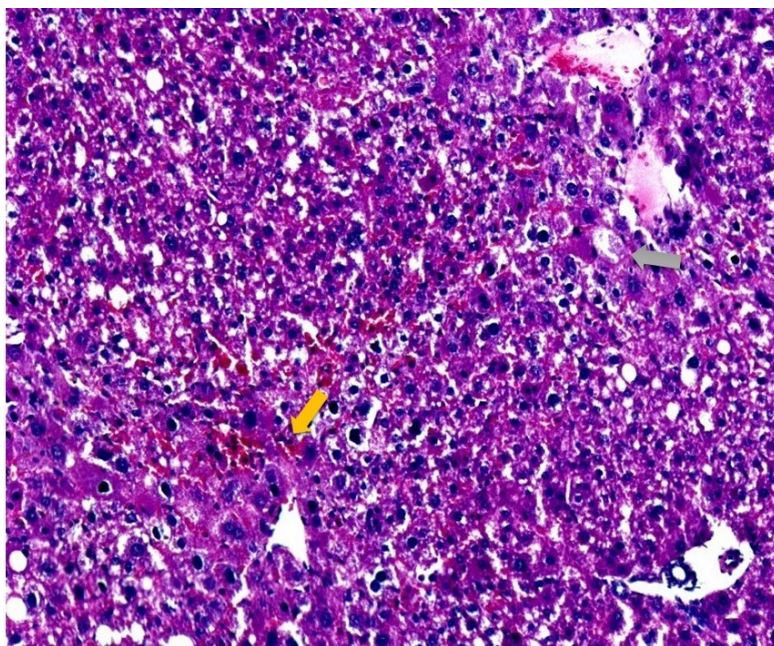


Abbildung 12: Abbildung eines histologisch aufgearbeiteten Leberschnittes (2 μ m Schnittdicke, H.E. Färbung) nach Leberteilresektion aus der Behandlungsgruppe 8 mg/kg KG Oxaliplatin für 5 Wochen, 10-fache Vergrößerung, pathologischer Befund: Sinusoidale Dilatationen in der Zone 3 (nahe der Zentralvene) sowie endothelialen Schädigungen mit perisinusoidalen Einblutungen (siehe gelber Pfeil). Zusätzlich Zeichen einer hepatozellulären Schädigung („hepatocyte ballooning“, siehe grauer Pfeil) sowie moderaten, makrovesikuläre Steatosis (Zone 1 und 2)

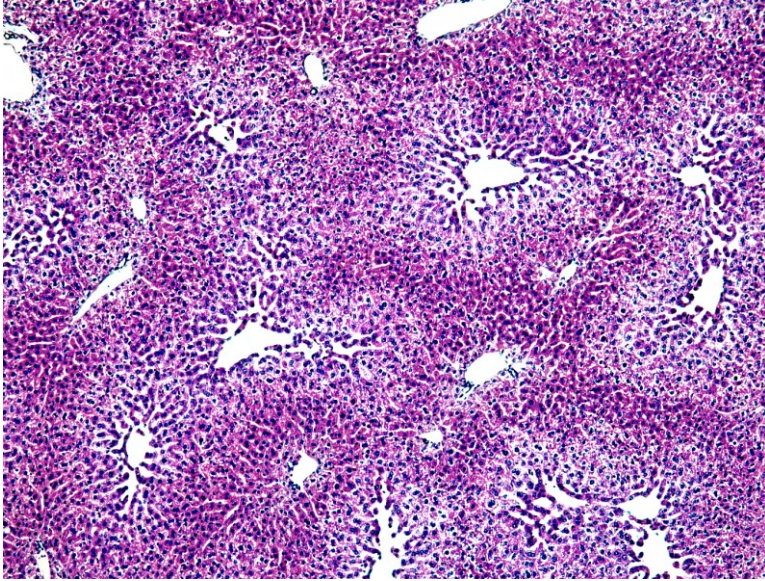


Abbildung 13: Abbildung eines histologisch aufgearbeiteten Leberschnittes (2 μ m Schnittdicke, H.E. Färbung) nach Leberteilresektion aus der Behandlungsgruppe 12 mg/kg KG Oxaliplatin für 5 Wochen, 10-fache Vergrößerung, pathologischer Befund: Es imponieren massive sinusoidale Dilatationen entlang aller Zentralvenen, hepatozelluläre Schädigungen, perisinusoidale Eiblutungen und Steatohepatitis

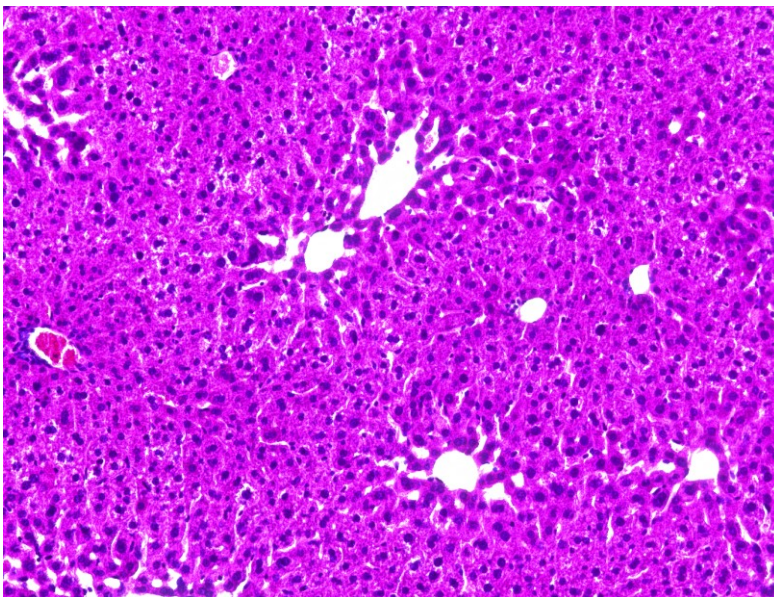


Abbildung 14: Abbildung eines histologisch aufgearbeiteten Leberschnittes (2 μ m Schnittdicke, H.E. Färbung) nach Leberteilresektion aus der Behandlungsgruppe 11 mg/kg KG Oxaliplatin für 5 Wochen, 20-fache Vergrößerung, pathologischer Befund: Es zeigen sich ausgeprägte sinusoidale Dilatationen entlang der Zentralvenen als spezifisches histopathologisches Kriterium des SOS bei insgesamt milder Ausprägung hepatozellulärer Schädigungen und perisinusoidale Einblutungen

3.4 Etablierung der Methodik zur Evaluierung der Leberregeneration mittels immunhistochemischer Färbungen

Die Methodik der immunhistochemischen Färbungen mit den Regenerationsparametern Ki-67 und BrDu sowie deren digitale Auszählung konnte in der ersten Versuchsreihe etabliert werden, so dass die Methodik in der zweiten Versuchsreihe angewandt werden kann. Die Abbildung 15 zeigt eine exemplarische Färbung aller Ki-67 positiven Zellkerne, auf Grundlage dessen sich alle positiven Zellkerne digital auszählen und in Prozentsätzen auswerten lassen (siehe Abb. 16). Aufgrund der geringen Versuchstierzahl sowie der hohen Ausfallquoten wurden diese immunhistochemischen Leberregenerationsparameter in der ersten Versuchsreihe nicht weiterführend ausgewertet.

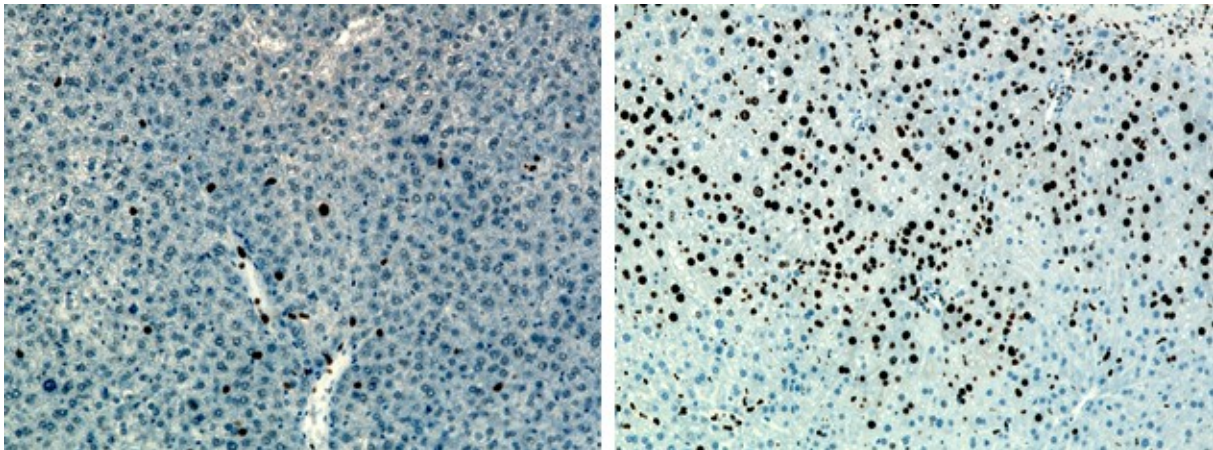


Abbildung 15: Beispielhafte immunhistochemische Färbung mit Ki-67 (8 mg kg/KG Oxaliplatin); links: Leber nach Leberteilresektion, rechts: Leber nach Finalisierung (48 Stunden)

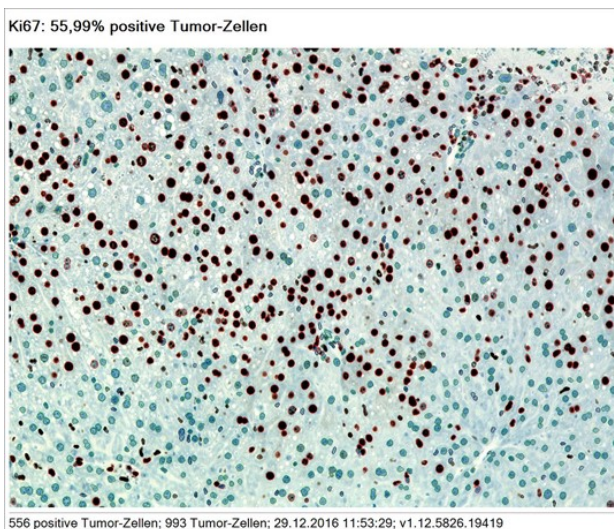


Abbildung 16: Beispielhafte digitale Auswertung der immunhistochemischen Färbung (Ki-67)

3.5 Untersuchungen in einer großen Kohorte

Nach Etablierung der optimalen Dosierung von Oxaliplatin zur Induzierung des SOS (11 mg für 5 Wochen) sowie des zusätzlichen VEGF-AK zur Untersuchung eines potenziellen protektiven Effektes auf die Entwicklung des SOS (10 mg VEGF-AK + 11 mg Oxaliplatin für 5 Wochen) wurden diese Dosierungen in der zweiten Versuchsreihe in einer großen Kohorte von insgesamt 196 Tieren, einschließlich drei Kontrollgruppen mit jeweils vier Finalisierungszeitpunkten (24, 36, 48, 72 Stunden), evaluiert. Wie bereits in der ersten Versuchsreihe (Etablierung) beobachtet, konnte in den Versuchsgruppen 14 und 15, die jeweils mit Oxaliplatin behandelt wurden, eine hohe Mortalität, insbesondere intra- und postoperativ, beobachtet werden (siehe Tbl. 18). In der Gruppe 14 haben lediglich 41,7 % (25 von initial 60 Tieren) den Endpunkt der Finalisierung erreicht, in der Gruppe 15 waren es 27,8 % (15 von initial 54 Tieren). In beiden Gruppen war die höchste Mortalität jeweils postoperativ zu beobachten (50 % in Gruppe 14; 66,67 % in Gruppe 15).

Versuchsgruppe	Therapieregime	Anzahl Versuchstiere zu Behandlungsbeginn	präoperativ verstorben	intraoperativ verstorben	postoperativ verstorben	Anzahl für histopathologische Auswertung	Endpunkt erreicht (Finalisierung)
14	Oxaliplatin 11 mg/5w	60	4	13	17	56	25
15	Oxaliplatin 11 mg + VEGF-AK 10 mg/5w	54	7	6	26	48	15
16	10 mg VEGF-AK	30	3	0	4	25	23
17	Glucose 5%	27	0	1	2	27	24
18	Glucose 5% + Sham-OP	25	0	0	1	25	24
	Gesamtanzahl	196	14	20	50	181	111

Tabelle 18: Übersicht der Versuchstieranzahl in den verschiedenen Versuchsgruppen innerhalb der zweiten Versuchsreihe und dessen Mortalitätsquoten während der Behandlung

Von den insgesamt 196 Versuchstieren der zweiten Versuchsreihe (vgl. Abb. 17) haben 182 Tiere die Chemotherapie- bzw. Placebobehandlungen überlebt und konnten operiert werden. Anschließend konnten hiervon 181 Proben der Leberpräparate histopathologisch ausgewertet werden.

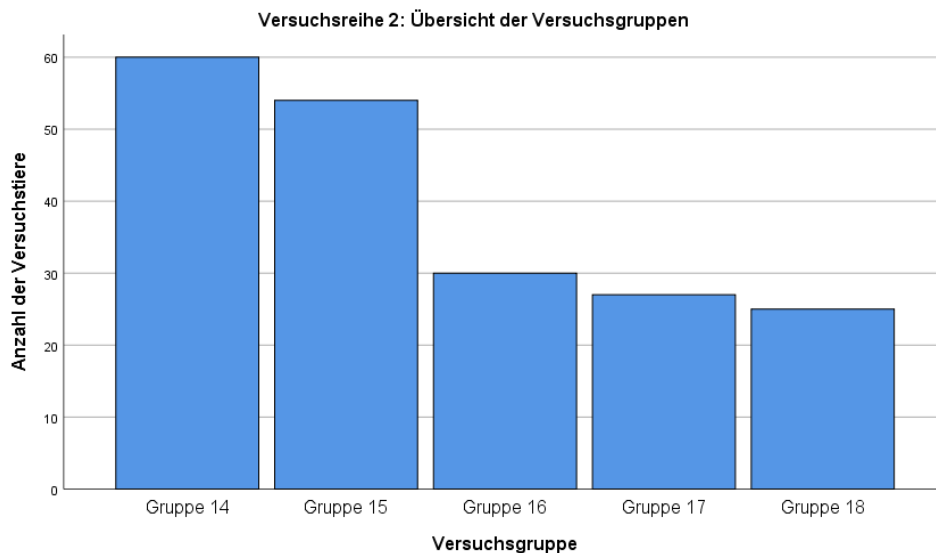


Abbildung 17: Übersicht der Versuchstierzahl (insgesamt 196) der zweiten Versuchsreihe in absoluten Zahlen

Die Ergebnisse der histopathologischen Auswertung sind der Abbildung 18 zu entnehmen und zeigen einen kausalen Zusammenhang zwischen einer Behandlung mit Oxaliplatin und einer damit verbundenen sinusoidalen Dilatation. In der Gruppe 14 haben insgesamt 40 von 56 ausgewerteten Versuchstieren (66,7 %) sinusoidale Dilatationen aufgewiesen. Dagegen konnten in den Kontrollgruppen 16 (VEGF-AK) und 17 (Glucose 5 %) in keinem Leberpräparat sinusoidale Dilatationen im Sinne eines SOS dargestellt werden, so dass insbesondere keine Induktion sinusoidaler Dilatationen mit dem VEGF-AK in Verbindung gebracht werden konnte. Lediglich in der Kontrollgruppe 18 (Glucose 5 % + Sham-OP) konnten bei 5 von 25 Tieren (20 %) sinusoidale Dilatationen beobachtet werden.

Die statistische Auswertung der beiden Vergleichsgruppen 14 (11 mg Oxaliplatin) und 15 (11 mg Oxaliplatin + 10 mg VEGF-AK) erbrachte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Ausprägung sinusoidaler Dilatationen (siehe Abb. 19). Wie beschrieben entwickelten 66,7 % der Tiere in der Versuchsgruppe 14 das SOS, im Vergleich zu 55,6 % der Tiere (30 von 54 Tieren) in der Versuchsgruppe 15.

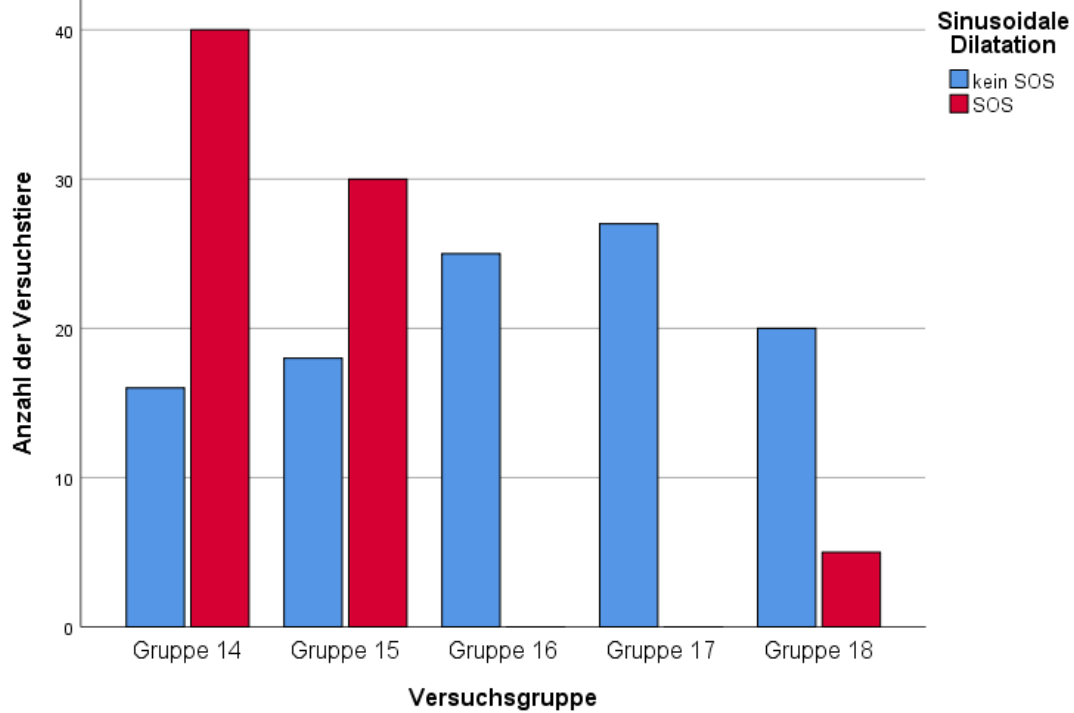


Abbildung 18: Übersicht der Versuchsgruppen der zweiten Versuchsreihe und die jeweilige Anzahl der Versuchstiere mit und ohne induziertem SOS in absoluten Zahlen

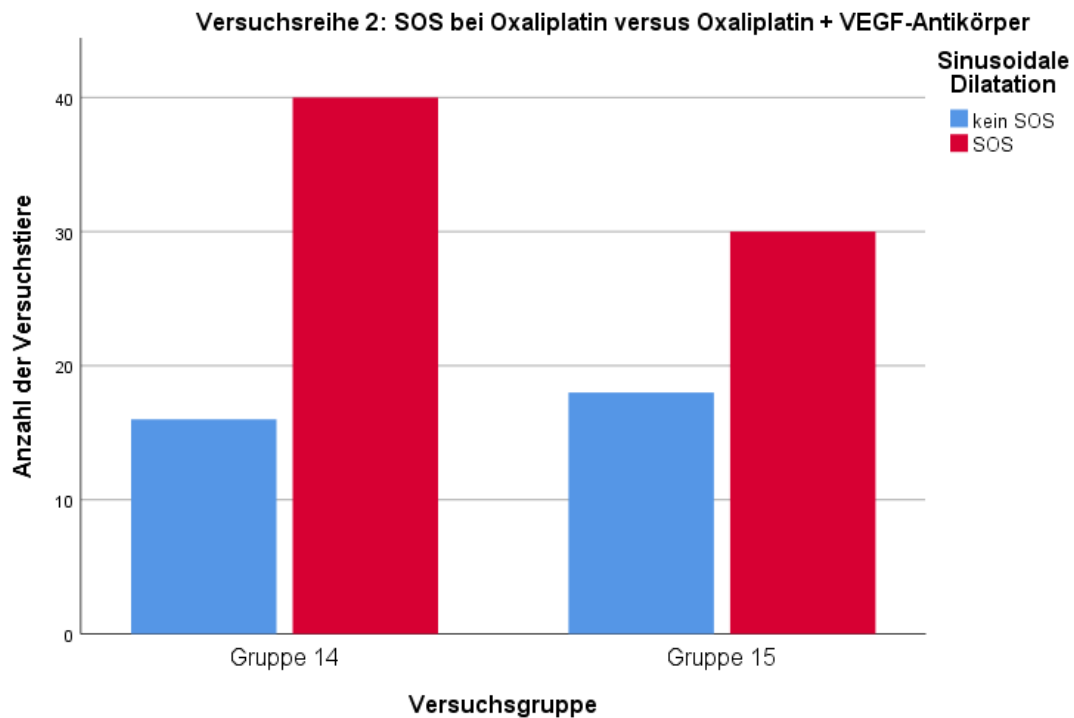


Abbildung 19: Übersicht der Versuchsgruppen 14 und 15 der zweiten Versuchsreihe und die jeweilige Anzahl der Versuchstiere mit und ohne induziertem SOS; jeweils in absoluten Zahlen

3.6 Expressionsunterschiede von VEGF-A, VEGFR-1 und VEGFR-2 innerhalb der Behandlungsgruppen mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Zum besseren Verständnis des möglichen therapeutischen Effektes einer medikamentösen VEGF-Inhibition auf die Entwicklung des SOS wurde die Expression von VEGF-A, VEGFR-1 sowie VEGFR-2 in den Leberpräparaten der Leberteilresektion mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht. Die Expression von VEGF-A unterschied sich im ersten Versuchsdurchlauf der Etablierung nicht signifikant zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen ((n= 14, Mittelwert (M): 5,021, Standardabweichung (SD): 10,926)) und den Tieren, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen (n= 22, M: 2,014, SD: 1,717), bei einem p-Wert von 0,210 (siehe Abb. 20).

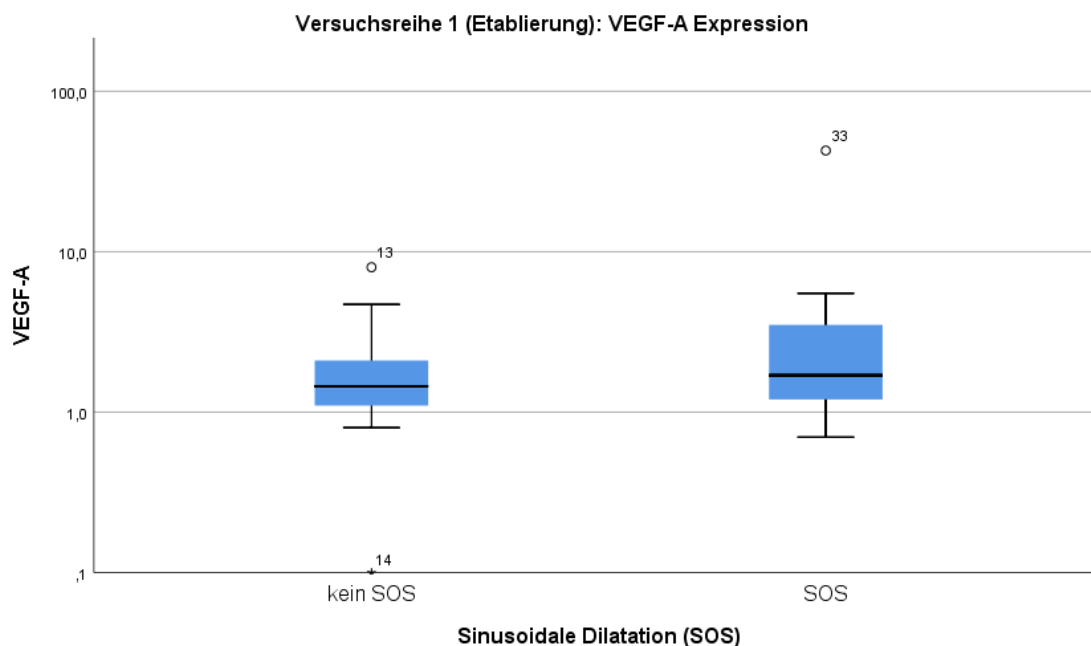


Abbildung 20: Vergleich der Expression von VEGF-A in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

Ebenso unterschied sich die Expression vom VEGF-Rezeptor-1 nicht signifikant zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufzeigten (n= 14, M: 4,229 SD: 5,622) und den Tieren, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen (n= 22, M: 2,459, SD: 2,819) bei einem p-Wert von 0,289 (siehe Abb. 21). Zuletzt zeigte sich auch bei der Expression vom VEGF-Rezeptor-2 kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen (n= 14, M: 2,836, SD:

4,817) und den Tieren, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen (n= 22, M: 1,895, SD: 1,310), bei einem p-Wert von 0,487 (siehe Abb. 22).

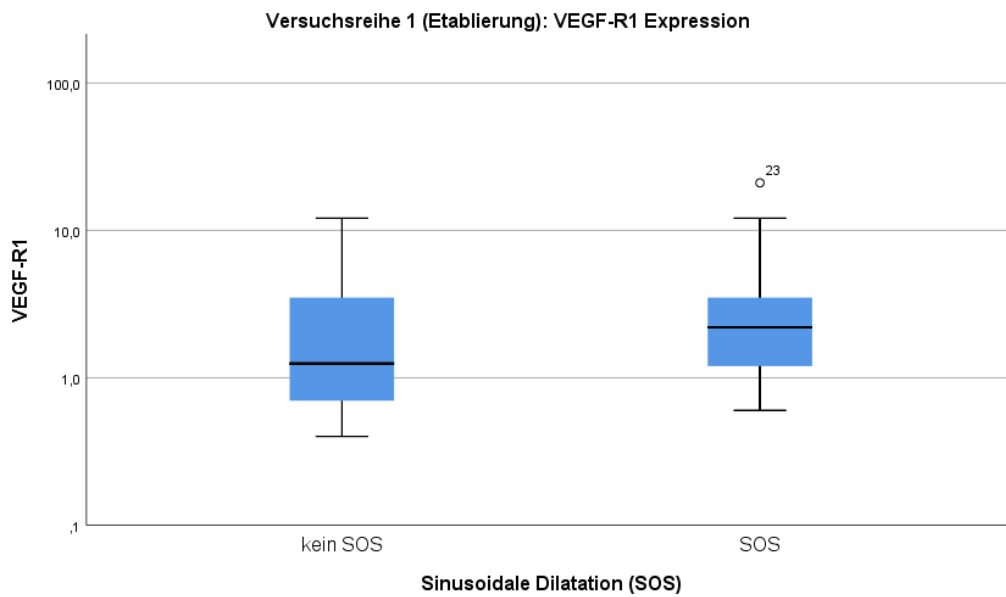


Abbildung 21: Vergleich der Expression von VEGF-Rezeptor-1 in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

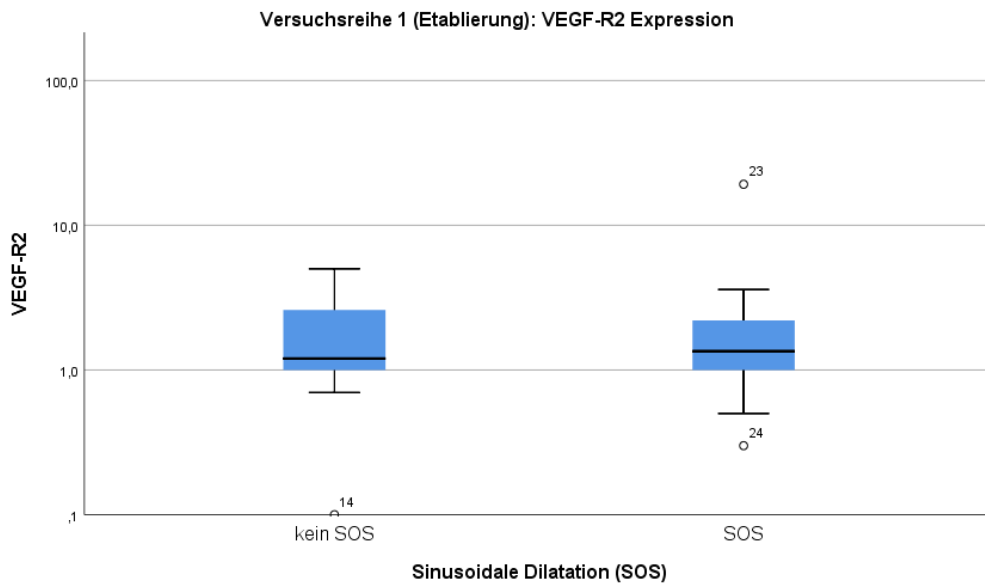


Abbildung 22: Vergleich der Expression von VEGF-Rezeptor-2 in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

3.7 Analyse relevanter Leberfunktions- und regenerationsmetabolite im Blutserum mittels Luminex Multiplex Assay

Zur weiteren Untersuchung möglicher pathophysiologischer Zusammenhänge des SOS sowie eines therapeutischen Effektes einer VEGF-Inhibition wurden im ersten Versuchsdurchlauf der Etablierung insgesamt sieben Schlüsselmoleküle im Blutserum (zum Zeitpunkt der Finalisierung) mittels Luminex Multiplex Assays analysiert.

Die VEGF-Expression unterschied sich nicht signifikant zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen ($n= 10$, $M: 29,40$ pg/mL, $SD: 22,555$) und den Tieren, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen ($n= 13$, $M: 22,54$ pg/mL, $SD: 28,661$), bei einem p-Wert von 0,528 (siehe Abb. 23). Jedoch lässt die zu beobachtende höhere Expression von VEGF in den Gruppen mit Vorhandensein des SOS eine Tendenz entnehmen, die eine entsprechend kausale Wirkung des VEGF-Inhibitors erklären würde.

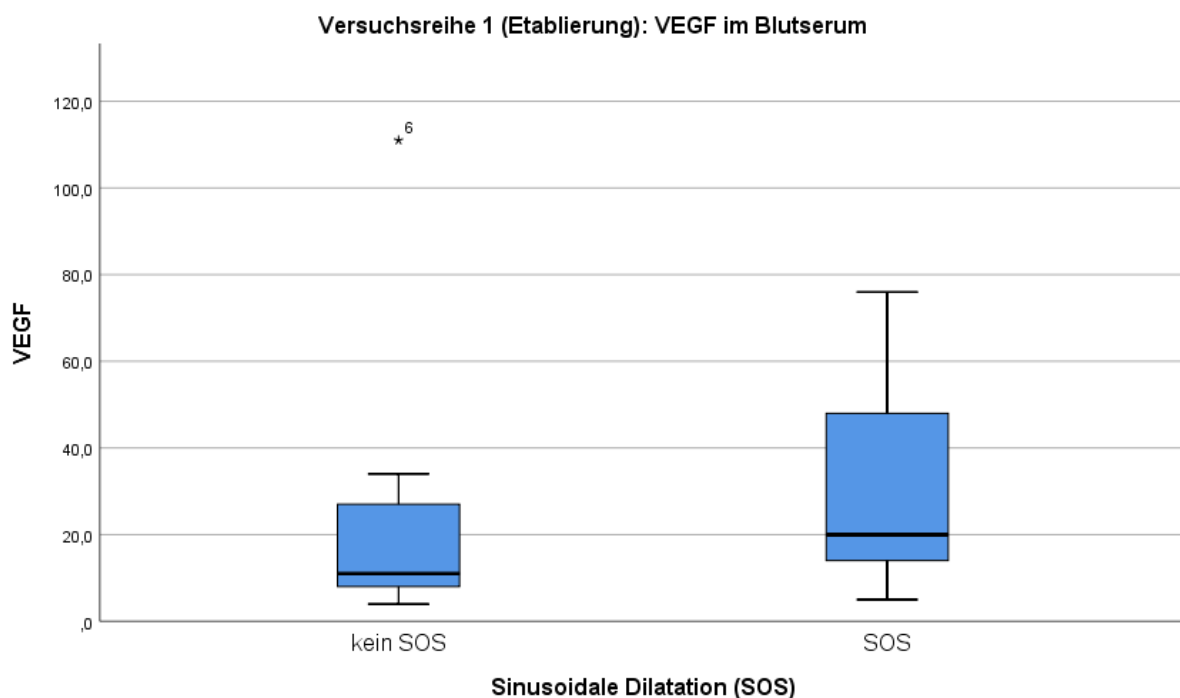


Abbildung 23: Vergleich der Expression von VEGF im Blutserum in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

Zur Untersuchung der Leberregeneration wurde die HGF („hepatocyte growth factor“) Expression im Blutserum untersucht, die sich nicht signifikant zwischen den Tieren unterschied, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen ($n= 10$, $M: 1266,20$ pg/mL, $SD: 1933,167$) und den Tieren, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen ($n= 13$, $M: 3217,31$ pg/mL, $SD: 8958,807$), bei einem p-Wert von 0,459. Des Weiterem nimmt das inflammatorische Interleukin-6 eine wichtige Rolle in der Leberregeneration sowie metabolismus ein, dessen Expression sich jedoch nicht signifikant zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen ($n= 9$, $M: 1391,67$ pg/mL $SD: 1779,786$) und den Tieren, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen ($n= 13$, $M: 1636,00$ pg/mL, $SD: 5199,210$) unterschied, bei einem p-Wert von 0,877. Neben dem Interleukin-6 wurde auch das antiinflammatorische Interleukin-10 gemessen, dessen Aktivität u. a. als hemmend auf die murine Leberregeneration beschrieben wurde²¹¹. Zwar unterschied sich dessen Expression nicht signifikant zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen ($n= 10$, $M: 226,30$ pg/mL, $SD: 549,355$) und den Tieren, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen ($n= 13$, $M: 26,27$ pg/mL, $SD: 69,583$), bei mit einem p-Wert von 0,205 (siehe Abb. 24). Jedoch zeigte sich eine deutliche Tendenz einer höheren Expression bei den Tieren, die das SOS entwickelt haben.

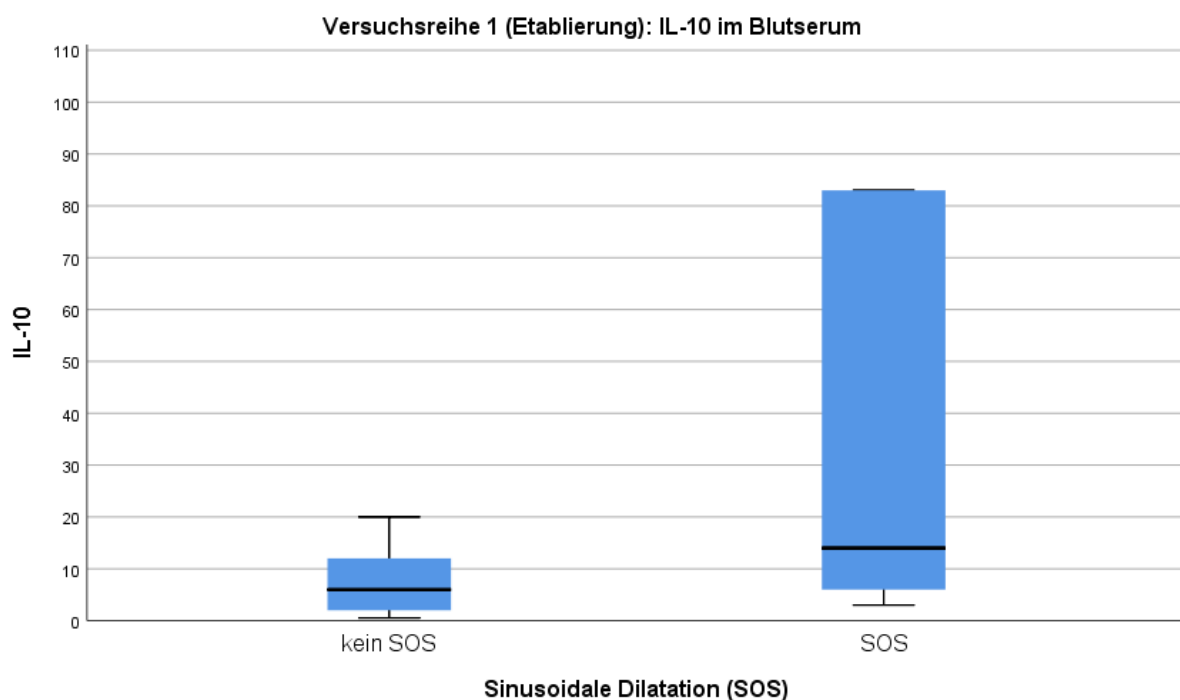


Abbildung 24: Vergleich der Expression von IL-10 im Blutserum in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

Die Matrix-Metalloproteinase-9 stellt als abbaufähiges Enzym für die Extrazelluläre Matrix ein wichtiges Protein bei Leberschädigungen- und regeneration dar und wurde bereits in experimentellen Arbeiten als Schlüsselmolekül in der Pathogenese des SOS beschrieben^{178,183}. In den Messungen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen (n= 11, *M*: 20483,09 pg/mL, *SD*: 26649,184) und den Tieren, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen (n= 15, *M*: 25605,20 pg/mL, *SD*: 39843,014), bei einem p-Wert von 0,698.

Matrix-Metalloproteinasen werden wiederum von endogenen „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) inhibiert. Die Expression der TIMP-1 unterschied sich nicht signifikant zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen (n= 10, *M*: 68048,00 pg/mL, *SD*: 150270,170) und den Tieren, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen (n= 13, *M*: 16021,54 pg/mL, *SD*: 18242,719), bei einem p-Wert von 0,227 (siehe Abb. 25).

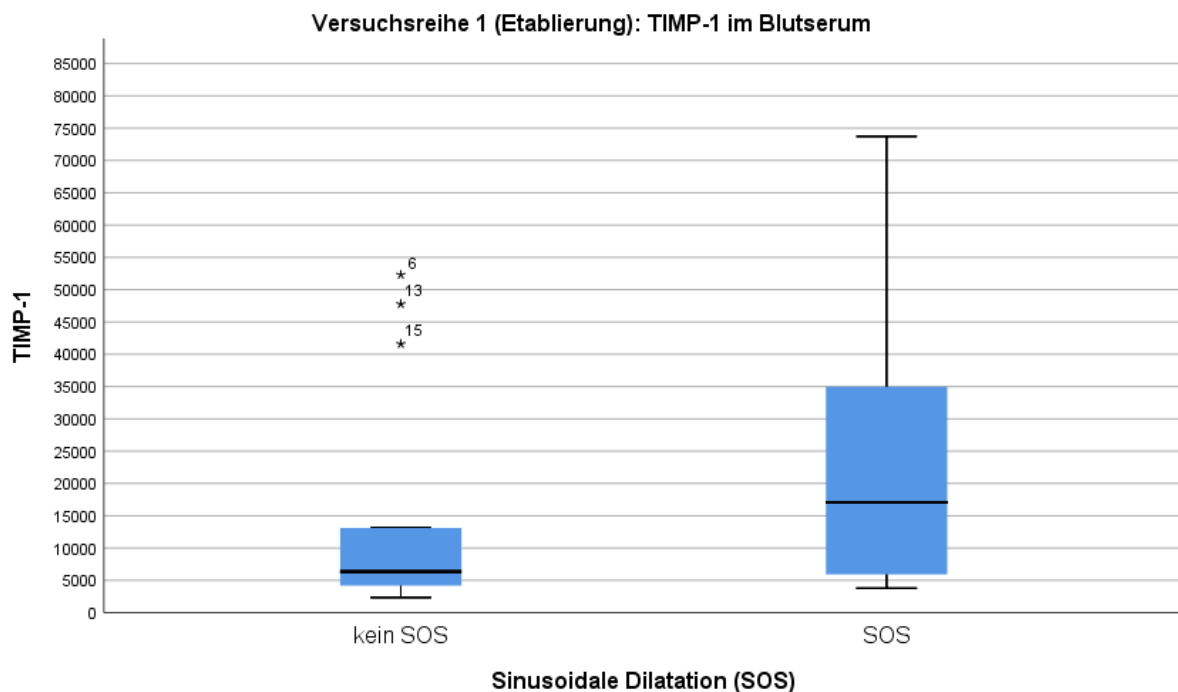


Abbildung 25: Vergleich der Expression von TIMP-1 im Blutserum in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

In aktuellen Publikationen wurde ebenfalls die Rolle des Plasminogen-Aktivator-1 (Serpine-1 Gen) in der Pathogenese des SOS beschrieben, der v. a. als Inhibitor der endogenen Fibrinolyse bekannt ist^{180,186-188}. Die Messungen der Serpin-E1 Expression unterschieden sich im ersten Versuchsdurchlauf der Etablierung nicht signifikant zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen (n= 11, *M*: 93486,09 pg/mL, *SD*: 126769,209) und denen, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen (n= 15, *M*: 32363,67 pg/mL, *SD*: 55908,314), bei einem p-Wert von 0,108 (siehe Abb. 26). Jedoch war auch hier die Tendenz einer höheren Expression bei Tieren mit SOS zu beobachten.

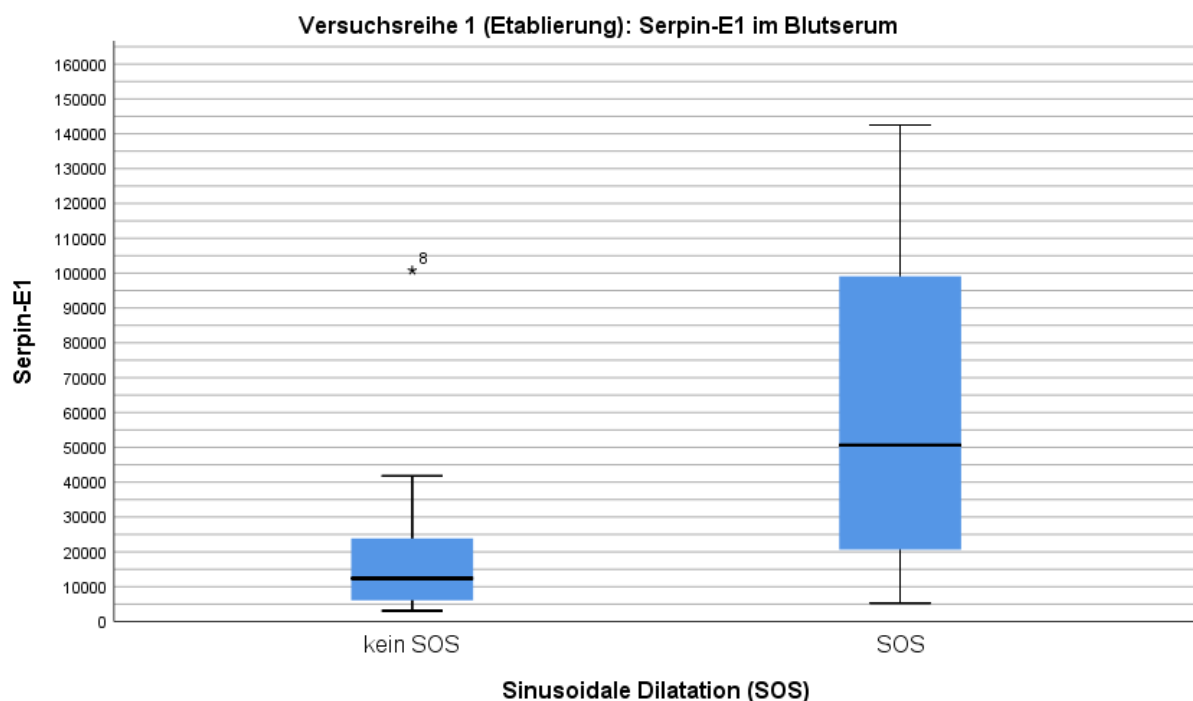


Abbildung 26: Vergleich der Expression von Serpin-E1 im Blutserum in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

3.8 Laborchemische Untersuchungen zur Beurteilung der Leberfunktion

Als Parameter der Leberfunktion wurden im ersten Versuchsdurchlauf die Aminotransferasen AST und ALT im Blutserum (zum Zeitpunkt der Finalisierung) laborchemisch gemessen. Die AST unterschied sich nicht signifikant zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen ($n= 6$, $M: 1945,17$ U/l, $SD: 1143,521$) und den Tieren, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen ($n= 11$, $M: 1353,09$ U/l, $SD: 1279,018$), bei einem p-Wert von 0,348 (siehe Abb. 27).

Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Messung von ALT zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen ($n= 10$, $M: 724,10$ U/l, $SD: 842,668$) und denen, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen ($n= 15$, $M: 439,53$ U/l, $SD: 626,844$), bei einem p-Wert von 0,375 (siehe Abb. 22). Beide Leberenzyme zeigten lediglich eine relative Erhöhung bei Auftreten des SOS.

Als weitere laborchemische Parameter einer Leberfunktionsstörung wurden Bilirubin und Albumin gemessen. Die Werte für Bilirubin wiesen keine signifikanten Veränderungen auf zwischen den Tieren mit sinusoidalen Dilatationen ($n= 10$, $M: 1,27$ mg/dl, $SD: 1,795$) und denen, die kein SOS entwickelten ($n= 14$, $M: 0,38$ mg/dl, $SD: 0,72$), bei einem p-Wert von 0,107 (siehe Abb. 29). Jedoch zeigten sich auch hier höhere Werte hinsichtlich der Mittelwerte bei Vorhandensein des SOS. Die Messungen von Albumin unterschieden sich dagegen weniger deutlich. Die Ergebnisse waren nicht signifikant zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen ($n= 10$, $M: 13,92$ g/l, $SD: 5,888$) und denen, die kein SOS entwickelten ($n= 14$, $M: 15,67$ g/l, $SD: 4,773$), bei einem p-Wert von 0,443 (siehe Abb. 30).

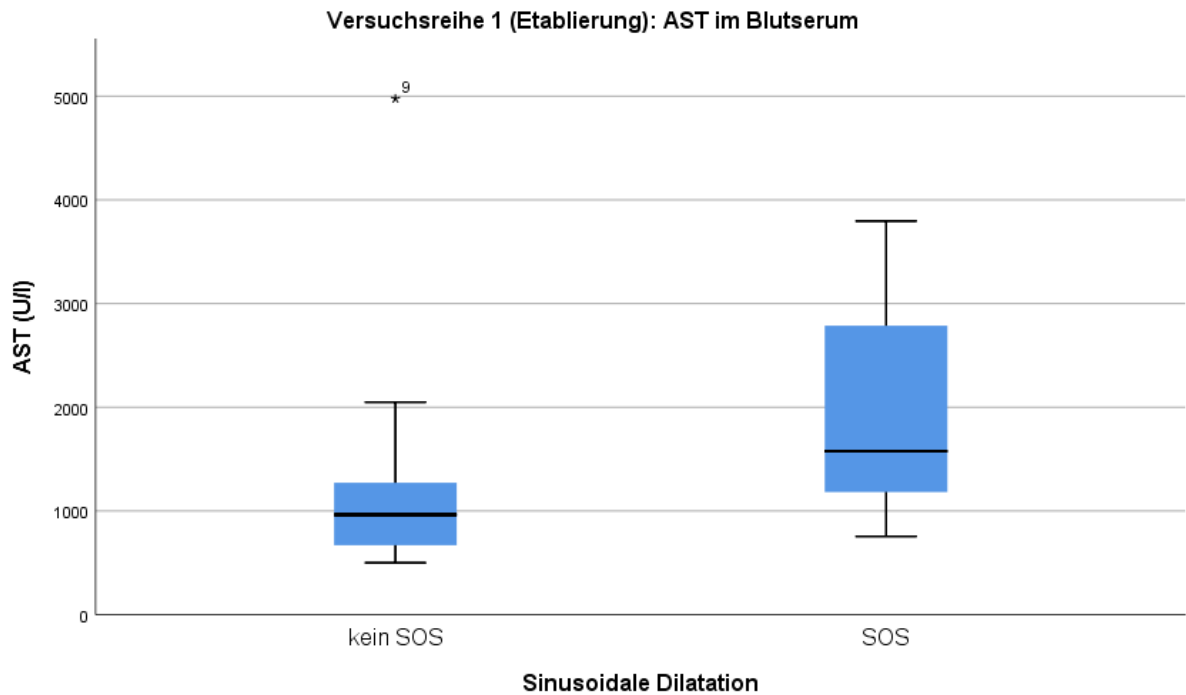


Abbildung 27: Vergleich der AST-Aktivität im Blutplasma in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

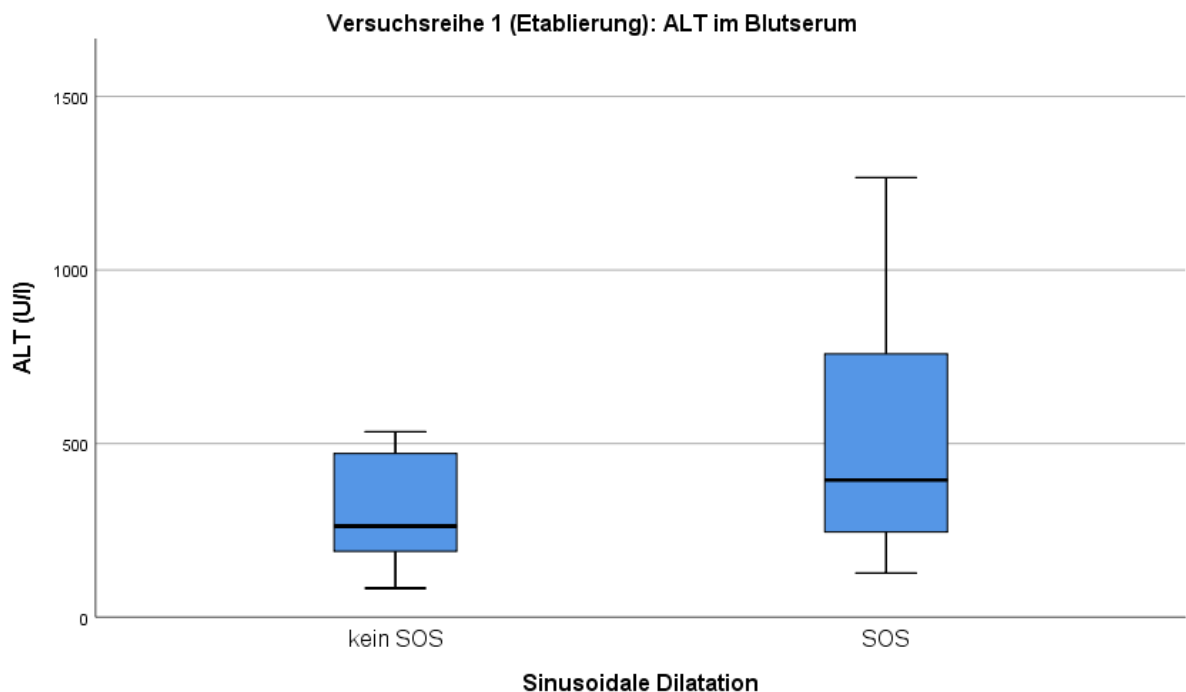


Abbildung 28: Vergleich der ALT-Aktivität im Blutplasma in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

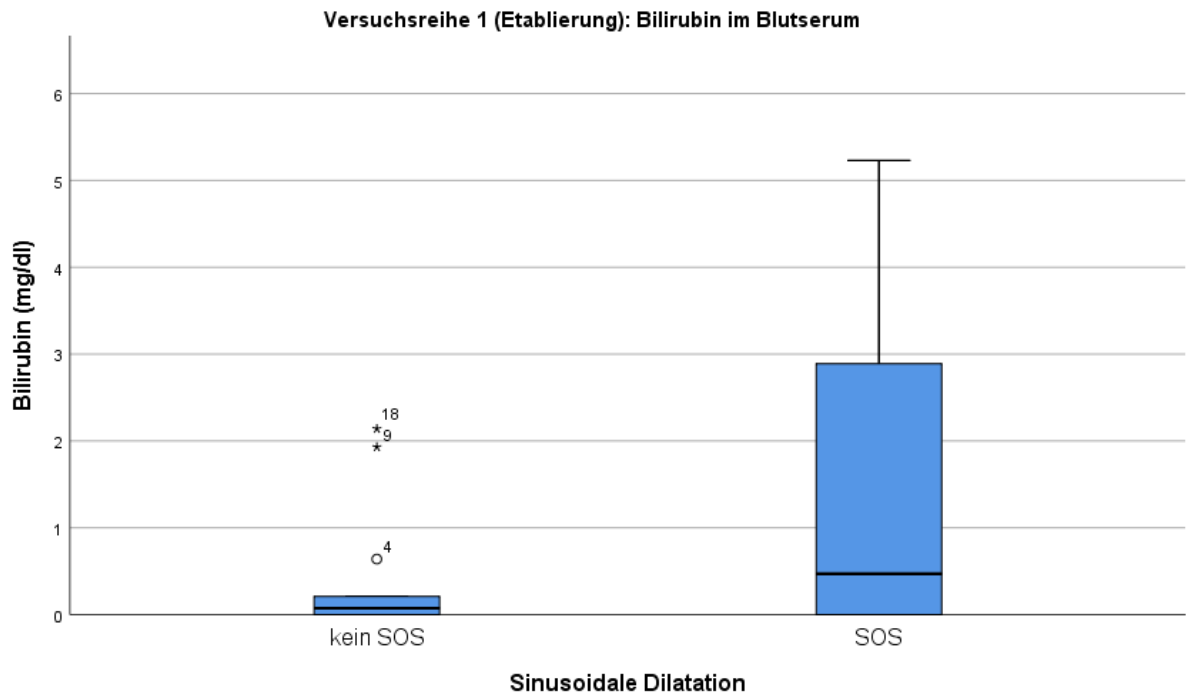


Abbildung 29: Vergleich der Bilirubin-Aktivität im Blutplasma in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

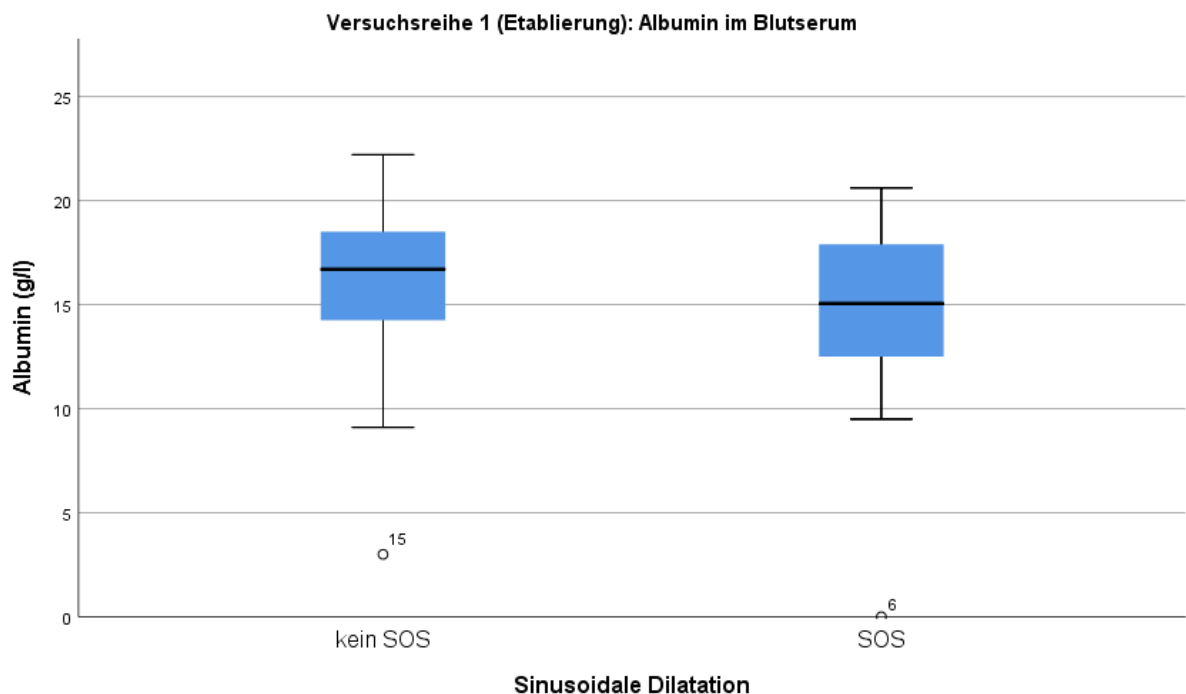


Abbildung 30: Vergleich der Albumin-Aktivität im Blutplasma in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

Zur weiteren Diagnostik der Leberfunktion sowie als zusätzlicher Cholestaseparameter wurde die Höhe der Alkalischen Phosphatase gemessen. Hierbei zeigten sich erneut erhöhte (Mittel-) Werte bei Vorhandensein des SOS, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren mit sinusoidalen Dilatationen (n= 10, M: 232,70 U/l, SD: 162,864) und denen ohne sinusoidale Dilatationen (n= 14, M: 228,21 U/l, SD: 348,368), bei einem p-Wert von 0,967 (siehe Abb. 31).

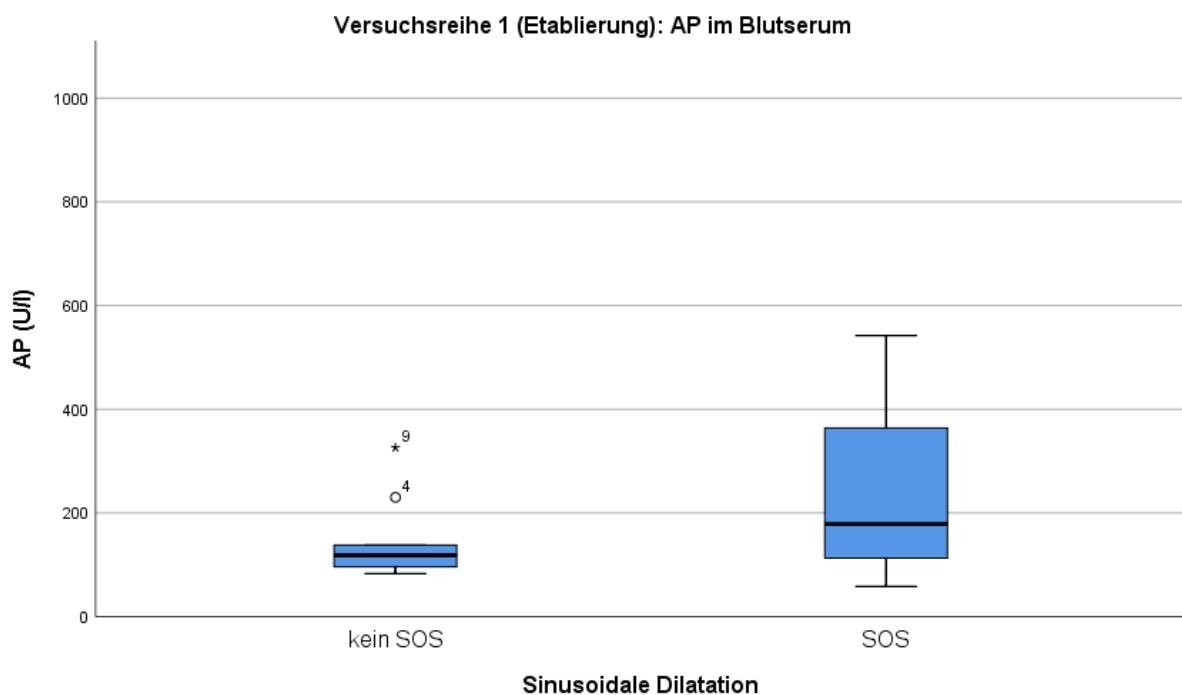


Abbildung 31: Vergleich der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität im Blutplasma in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

3.9 Analyse der relativen Leberregeneration und des relativen Milzgewichtes

Im ersten Versuchsdurchlauf zeigte sich kein signifikanter Unterschied der relativen Leberregeneration (nach Gewicht) zwischen den Tieren mit SOS ($n= 9$, $M: 0,629$, $SD: 0,0462$) und Tieren ohne SOS ($n= 15$, $M: 0,654$, $SD: 0,189$), bei einem p-Wert von 0,694 (siehe Abb. 32).

Ebenso wurde das Gewicht der Milz nach der Finalisierung (48 Stunden postoperativ) gewogen und anschließend der Quotient mit dem Körpergewicht vor der Leberteilresektion gebildet. Der errechnete Wert als Aussage des relativen Milzgewichtes unterschied sich nicht signifikant zwischen den Tieren, die sinusoidale Dilatationen aufwiesen ($n= 14$, $M: 0,018$ bzw. 1,8 % des Gesamtgewichtes, $SD: 0,012$) und denen, die keine sinusoidalen Dilatationen aufwiesen ($n= 17$, $M: 0,026$ bzw. 2,6 % des Gesamtgewichtes, $SD: 0,01$), bei einem p-Wert von 0,084 (siehe Abb. 33).

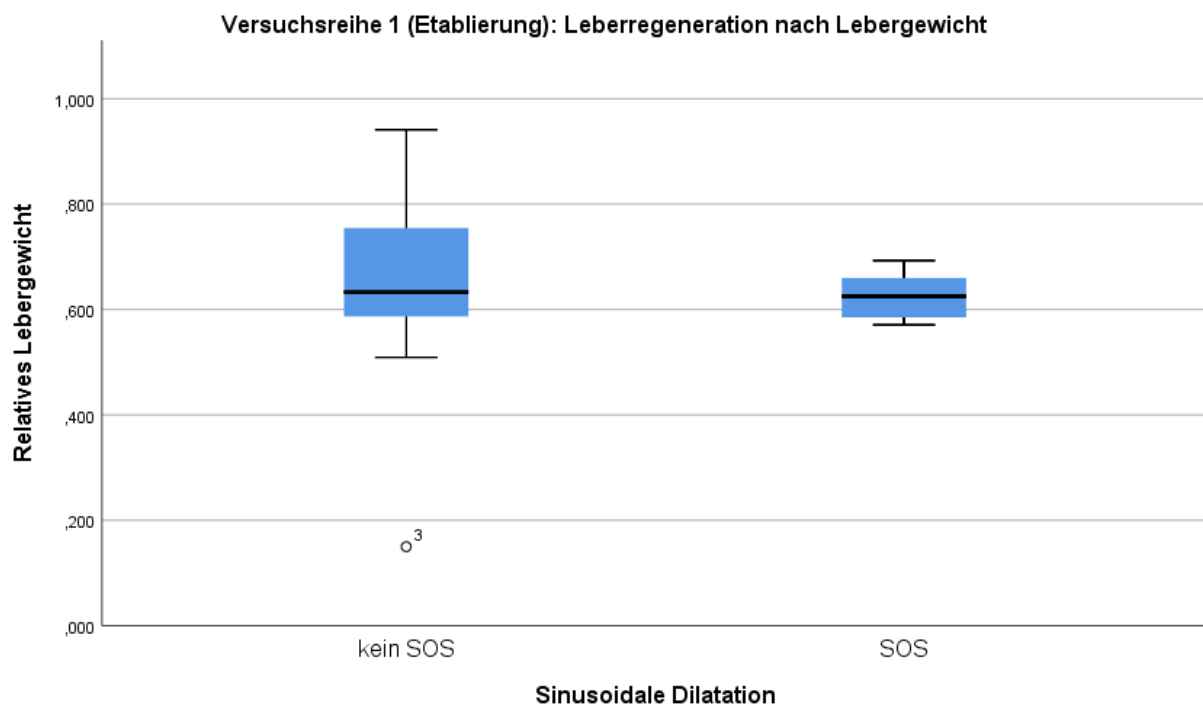


Abbildung 32: Vergleich der relativen Leberregeneration in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

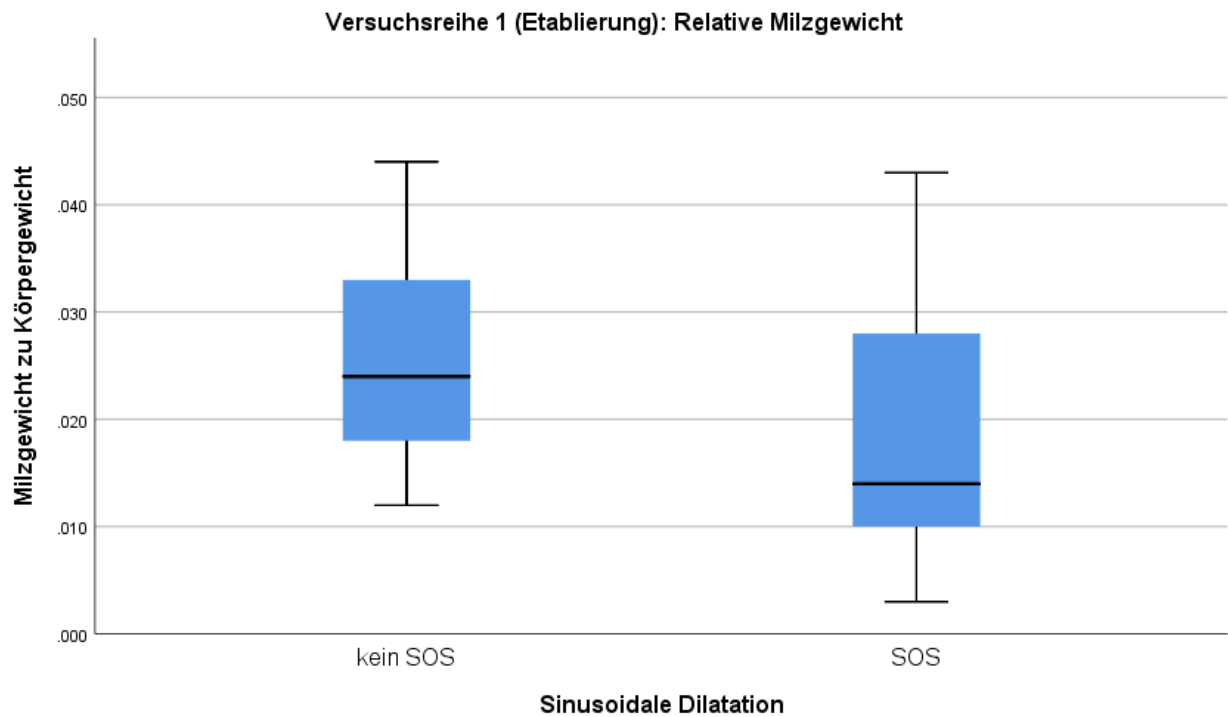


Abbildung 33: Vergleich des relativen Milzgewichts in der ersten Versuchsreihe zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten. Daten werden angegeben mit Mittelwert +/- und Standardabweichung

4. Diskussion

Die chirurgische Leberteilresektion stellt weiterhin die einzige kurative Therapieoption in der Behandlung kolorektaler Lebermetastasen dar^{40,45}. In deren multimodalen Behandlung hat die neoadjuvante Chemotherapie, substanziiell basierend auf Oxaliplatin sowie zunehmend in Kombination mit dem VEGF-AK Bevacizumab, an Bedeutung gewonnen. Insbesondere zur Konversion initial nicht resektabler Lebermetastasen in einen resektablen Befund sowie auch zu einem besseren Langzeitüberleben bei initial resektablen Metastasen⁷⁷. In der vorliegenden Arbeit wird aufgrund mangelnder experimenteller Modelle, zum besseren Verständnis bisher primär klinischer Beobachtungen, erstmals die Etablierung eines Oxaliplatin-induzierten SOS im Mausmodell beschrieben. Dieses Modell stellt eine neue Grundlage zur Untersuchung pathophysiologischer Prozesse des SOS dar und insbesondere für eine Untersuchung einer potenziell protektiven Wirkung eines VEGF-AK auf die Entwicklung des SOS und die Leberregeneration.

Hintergrund und damit Grundlage der vorliegenden Arbeit stellen die mangelnden tierexperimentellen Modelle des SOS dar, die (1.) weder ausschließlich das SOS mit Oxaliplatin induziert haben, noch dabei (2.) Untersuchungen der Leberregeneration nach Leberteilresektion ermöglichen sowie zusätzlich (3.) die Behandlung eines VEGF-AK untersuchen. Die ersten experimentellen Arbeiten wurden mit dem klinischen Hintergrund des SOS als Komplikation nach myeloablativer Stammzelltransplantation in den 1960er bis 1990er Jahren veröffentlicht, jedoch ohne den Erfolg eines reproduzierbaren Modells für systematische Untersuchungen¹⁷¹⁻¹⁷⁶. Das wichtigste (Ratten-) Tiermodell wurde 1999 von De Leve et al. publiziert, welches als wichtigste Grundlage für das bisherige pathophysiologische Verständnis fungiert¹⁷⁷. Jedoch wurde in diesem Modell das SOS durch eine einmalige Gabe des pflanzlichen Pyrrolizidinalkaloid MCT induziert, so dass klinisch-translationalen Schlussfolgerungen anhand des Modells nur eingeschränkt möglich sind. Nachdem im Jahr 2004 Rubbia-Brandt et al. erstmalig das SOS bei Patienten mit KRLM nach einer Oxaliplatin-basierenden Chemotherapie Behandlung beschrieben¹⁴³, wurde erst im Jahr 2013 von Robinson et al. erstmalig das SOS in einem Mausmodell nach FOLFOX-Behandlung induziert und gilt damit neben De Leve et al. als bisher zweites publiziertes Tiermodell des SOS¹⁸⁴. Dieses Modell stellt zwar bisher die beste experimentelle Grundlage für klinisch-

translationale Forschungsvorhaben dar, jedoch mit dem Nachteil, dass neben Oxaliplatin auch Folinsäure sowie 5-FU zur Induktion des SOS verwendet wurden und damit die spezifischen pathophysiologischen Zusammenhänge von Oxaliplatin und dessen Hepatotoxizität nur eingeschränkt beurteilt werden können. Des Weiteren erfolgte in dem Modell keine Leberteilresektion zur Untersuchung der Leberregeneration und ebenfalls keine zusätzliche Therapie mit einem VEGF-Inhibitor.

4.1 Evaluation der Etablierung des Tiermodells und der Dosisfindungsstudie

4.1.1 Diskussion der Methodik des Tiermodells und der Dosisfindungsstudie

Die systematische Vorgehensweise der ersten Versuchsreihe (Etablierung des Studienprotokolls) stellt eine wesentliche, methodisch qualitative Stärke der vorliegenden Arbeit dar. Hierbei wurde eine schrittweise Dosisfindungsstudie durchgeführt, die zunächst sowohl die Dauer, als auch die Dosis von Oxaliplatin beinhaltete. Zusätzlich wurde im Sinne des Tierschutzes ((Prinzip der „3R“: Replace (Vermeiden), Reduce (Verringern), Refine (Verbessern)) sowie auf Grundlage der aktuellen Literatur eine geringe Tieranzahl von drei Tieren pro Behandlungsgruppe gewählt, um mit insgesamt zehn Versuchsgruppen und vier unterschiedlichen Dosierungen das optimale Behandlungsregime von Oxaliplatin zu ermitteln, um sowohl das SOS zu induzieren, als auch ein postoperatives Überleben zur Evaluation der Leberregeneration zu ermöglichen²¹². Mit Blick auf die relevante aktuelle Literatur lässt sich nicht entnehmen, ob neben den publizierten Daten der Tieranzahl möglicherweise weitere (verstorbene) Tiere in Vorversuchen für den Gesamtversuch notwendig gewesen wären^{177,184,194}. Jedoch führte die limitierte Tieranzahl in der ersten Versuchsreihe aufgrund der strikten örtlichen Tierschutzvorgaben gleichzeitig zu methodischen Limitationen. Die Gesamttieranzahl der ersten Versuchsreihe hätte aus wissenschaftlicher Sicht idealerweise um einige Versuchsgruppen erweitert werden können, um differenzierter die Abstufungen in Dosierung und Behandlungsdauer zu untersuchen. Ebenso kann die Gruppengröße von jeweils drei Tieren pro Behandlungsgruppe als zu gering betrachtet werden, da diese aufgrund der hohen Ausfallquote zu einer Limitation in der statistischen Auswertung führte. Andererseits stellt die zweite Versuchsreihe mit einer Gesamttieranzahl von 196 eine starke Gesamtgröße für weiterführende, methodische Auswertungen dar. In der zu vergleichenden Literatur wurden Gesamtversuchstiergrößen von stets unter 100

Versuchstieren publiziert (z. B. 30 Mäuse bei Robinson et al., 30 Ratten bei De Leve et al., 98 Ratten bei Hubert. et al.)^{177,184,194}.

Eine weitere methodische Stärke der vorliegenden Arbeit besteht in der geringen Anzahl der Operateure, die zu einer verbesserten Vergleichbarkeit, Reproduzierbarkeit und damit reduzierten statistischen Verzerrtheit (engl. „bias“) führt. Zusätzlich hatten alle der insgesamt vier beteiligten Operateure vorab ein Lehrprogramm durchlaufen, so dass bereits mit Beginn der ersten Versuchsreihe der jeweilige Stand der Lernkurve als fortgeschritten anzusehen war. Von den insgesamt 204 Leberteileresektionen wurden 187 (92 %) von den zwei Hauptoperateuren durchgeführt. Nur die anteiligen 34 Leberteileresektionen in der ersten Versuchsreihe wurden lediglich zu 41 % von den beiden Hauptoperateuren durchgeführt und die restlichen 59 % von zwei weiteren, erfahrenen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. In den zum Vergleich stehenden, publizierten Studien sind diese Informationen nicht beschrieben, stellen sie aus der eigenen Erfahrung jedoch einen relevanten, methodischen Parameter für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dar (u. a. bezüglich der Dauer der Operationen oder auch der Zugstärke der Ligaturen um die Leberlappen, die komplikationstechnisch zu Mikroläsionen/Ischämien führen können). In den chirurgischen Fachdisziplinen ist die Bedeutung operativer Lernkurven und die signifikant verbesserten Ergebnisse bei quantitativen Mindestmengen lange bekannt und etabliert. Die Leberteileresektion selbst konnte mit minimalen Adaptationen (z. B. präoperative Medikation, vgl. Tbl. 4) gemäß der international etablierten, an die Anatomie der Maus adaptierte Methode nach „Higgings und Anderson“ umgesetzt werden und stellte damit optimale Voraussetzungen für den Vergleich mit publizierten Daten sowie zukünftigen Arbeiten dar^{197,199}.

Neben der Operation stellten die wöchentlichen intraperitonealen Applikationen eine weitere invasive und damit kritische methodische Maßnahme des Studienprotokolls dar. Mit Blick auf die Anatomie der Maus, deren Schwierigkeiten intravenöser Punktionen und der damit verbundenen Tatsache, dass alle relevanten Publikationen durchweg die intraperitoneale Applikation (sowohl in der Maus, als in der Ratte) durchführten, stellte diese auch in unserem Modell die Applikationsform der Wahl dar. Die Entscheidung, alle intraperitonealen Applikationen von Oxaliplatin unter

einer 2,5-prozentigen Isofluran Kurznaarkose durchzuführen, zeigte sich als sichere und komplikationslose Methode. Diese erhöhte nicht nur die eigene Sicherheit im Umgang mit dem Zytostatikum, sondern verringerten auch aufgrund der vorübergehend ausgeschalteten Abwehrspannungen- und bewegungen des Tieres (bei reduzierten intraabdominellen Druckverhältnissen) die Komplikationsgefahr. Anschließend erreichten die Tiere, nach einer kurzen Aufwachphase von gewöhnlich wenigen Sekunden, schnell und problemlos wieder ihren Normalzustand. Mit den Vorgaben einer minimalen Belastung der Versuchstiere wurde entschieden, die Applikationen des VEGF-AK im Wachzustand zu applizieren. Hierbei wurde auch in Betrachtung genommen, dass die Tiere (mit Ausnahme der Versuchsgruppe 16, die als Kontrollgruppe ausschließlich mit dem VEGF-AK behandelt wurden) am Tag zuvor bereits zur Applikation des Oxaliplatin einer Isofluran-Kurznaarkose unterzogen worden sind und trotz des risikoarmen Nebenwirkungsprofils von Isofluran, eine stets geringstmögliche pharmakologische Beeinflussung auf die Leberregeneration angestrebt wurde^{199,213,214}. Es muss jedoch kritisch gesehen werden, dass damit die Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsgruppen geringfügig eingeschränkt worden ist. In Anbetracht des geringen toxikologischen Profils von Isofluran und dessen geringer Menge bei kurzer Inhalationsdauer, sowie in Gesamtschau der Toxikologie der applizierten Medikamente während des gesamten Versuchsdurchlaufes, ist jedoch von keinem relevanten Einfluss von Isofluran auszugehen. Ein weiterer, interessanter Einflussfaktor stellt das Futter dar. Bisher hatten ausschließlich Robinson et al. in ihrem Tiermodell beschrieben, dass die im Standardtierfutter beinhaltenen Phytoöstrogene einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer Leberfibrose sowie einer hepatischen Steatose zu haben scheinen, so dass alle Tiere in der vorgestellten Studie ausschließlich Zugang zu phytoöstrogenfreiem Futter hatten, um diesen möglichen Störfaktor konsequent auszuschließen^{184,215,216}.

Des Weiteren wurden in dem Versuch ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet, um einen weiteren möglichen Störfaktor in der Vergleichbarkeit der Leberregeneration auszuschließen, da bisher nicht eindeutig geklärt ist, inwieweit hierbei mögliche genetische Differenzen der biologischen Geschlechter einen relevanten Einfluss auf die methodischen Auswertungen, insbesondere der Leberregeneration haben könnten^{199,217-219}. Dagegen ist wesentlich besser untersucht, inwieweit das Alter der Tiere, spezifisch der Maus, einen Einfluss auf die

Leberregeneration hat: Während besonders junge Tiere eine vergleichsweise schnelle Leberregenerationskapazität aufweisen, nimmt diese bei älteren Tieren ab einem Lebensalter von 10 Wochen wiederum ab, so dass von Mitchell et al. (2008) und dessen Adaptierung des Protokolls der Leberteilresektion in Mäusen von Higgins und Anderson (1931), die Verwendung von Mäusen in einem Lebensalter zwischen 8 und 14 Wochen für Untersuchungen der Leberregeneration empfohlen wird^{199,217,220}. In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere der ersten Versuchsreihe im Durchschnitt in einem Alter von fünf Wochen in den Versuch aufgenommen (zu Beginn der Applikationen), so dass sie zum Zeitpunkt der Operation, je nach Versuchsgruppe, zwischen 8 und 10 Wochen alt waren und damit dem idealen Ausgangsalter im Hinblick der Beurteilung der Leberregenerationskapazität entsprachen. Dieses Ausgangsalter wurde auch in der zweiten und größeren Versuchsreihe fortgeführt, jedoch wurden jeweils 30 bzw. 24 Versuchstiere der Versuchsgruppe 14 (Oxaliplatin) und 15 (Oxaliplatin + VEGF-AK), ergo jeweils ca. 50 % der beiden Versuchsgruppen, mit einem Ausgangsalter von 8 bis 10 Wochen eingeschlossen. Dies basierte aufgrund der kritischen Erfahrung mit den jeweils ersten 30 Tieren der beiden Versuchsgruppen und deren hohen intra- und postoperativen Mortalität, die u. a. auf das geringe präoperative Ausgangsgewicht zurückgeführt werden konnte. Es konnte hierbei eine kritische präoperative Körpergewichtsgrenze bei ca. 22-24 g ausgemacht werden, da die Versuchstiere mit einem präoperativen Ausgangswert unterhalb dieser Gewichtsgrenze eine deutliche erhöhte Mortalität aufwiesen. Diese Beobachtung hob die Notwendigkeit und Bedeutung des Körpergewichtes hervor und die damit verbundenen physischen und metabolischen Reservekapazitäten, da die postoperative Phase (max. 72 Stunden) als die körperlich belastete und damit kritischste Zeit während des Versuches anzusehen ist. Schließlich veranlasste diese Erkenntnis in Abstimmung mit der zuständigen Tierschutzbehörde, im Sinne des Tierschutzes die zu diesem Zeitpunkt der Zwischenanalyse noch ausstehenden Versuchstiere der beiden Behandlungsgruppen 14 und 15 der zweiten Versuchsreihe (n= 54), mit dem ebenfalls höheren Ausgangsalter bei einem präoperativen Gewicht unterhalb von 24 g nach der Leberteilresektion noch unter Narkose zu finalisieren und die Versuchstiere damit vor der Belastung der postoperativen Phase zu schützen. Das unterschiedliche Ausgangsalter der Versuchstiere in den Versuchsgruppen 14 und 15 stellt damit zwar einerseits einen Kritikpunkt der Arbeit dar, andererseits wurde aufgrund einer damit geringeren

Mortalitätsquote und damit erhöhten Versuchstieranzahl, die den gesamten Versuchsdurchlauf überlebten, eine bessere methodische Gesamtauswertung bei gleichzeitiger Einhaltung und besonderer Beachtung des Tierwohles/-schutzes ermöglicht.

Eine weitere mögliche Adaptierung des Versuchsprotokolls bezüglich der hohen intra- und postoperativen Mortalität könnte in einer längeren Pause zwischen der letzten Chemotherapie-Applikation und der Operation liegen. Auf Grundlage klinischer Studien mit einem hohen Patientenkollektiv wird aktuell ein Intervall von fünf Wochen empfohlen, um einerseits postoperative Komplikationen aufgrund der Chemotherapie induzierten Hepatotoxizität zu verringern und andererseits die Gefahr einer Tumorprogression zu vermeiden^{79,111,158,159}. Die Wochenanzahl ist sicherlich nicht unmittelbar auf ein Mausmodell übertragbar, jedoch wäre es von Interesse, beispielsweise den Effekt eines zwei- und dreiwöchigen therapiefreien Intervalls auf die Ausprägung des SOS sowie die intra- und postoperativen Komplikationen zu untersuchen.

4.1.2 Diskussion der Ergebnisse des Tiermodells und der Dosisfindungsstudie

Es konnte schließlich anhand des differenzierten Therapieregimes die enge therapeutische Breite der Dosierung von Oxaliplatin in Kombination mit dem Behandlungszeitraum herausgestellt werden. Während sich ein Behandlungszeitraum von drei Wochen, unabhängig der Dosierung, als unzureichend zur Induktion des SOS herausstellte, zeigte sich dagegen bei einem Behandlungszeitraum von fünf Wochen bei allen vier Versuchsgruppen eine Quote von 66 % der erfolgreichen SOS-Induktion mit einer Gesamtmortalität von 50 %. In Abwägung der SOS-Induktion sowie des Schweregrades der Nebenwirkungen, insbesondere im Hinblick auf die postoperative Belastung, zeigte sich schließlich die ideale Dosierung bei 11 mg/kg KG Oxaliplatin für eine sichere Induzierung des SOS. Bisher publizierte Studien untersuchten stets nur die Hepatotoxizität bei verschiedenen Dosierungen von Oxaliplatin und bereits zuvor festgelegten Intervallen bezüglich der Therapiedauer, sowie insgesamt in nur schwer miteinander zu vergleichenden Tiermodellen. Die zwei einzigen vergleichbaren Arbeiten in einem Mausmodell wurden von Keizmann et al. und Robinson et al. dargestellt: Keizmann et al. publizierten 2010 ein Mausmodell, in dem Oxaliplatin wöchentlich in den

Dosierungen 6 mg/kg KG, 10 mg/kg KG und 14 mg/kg KG für jeweils 4 Wochen intraperitoneal appliziert worden ist¹⁹⁵. In diesem Modell starben alle Tiere in den Behandlungsgruppen mit 10 und 14 mg/kg KG Oxaliplatin. Des Weiteren entwickelten alle Tiere eine Chemotherapie-assoziierte Steatohepatitis, wobei hier das SOS nicht separat beschrieben wurde. Diese hohe Mortalität lässt sich in der eigenen Arbeit bei einer Dosierung von 10 mg/kg KG nicht aufzeigen. Die Studie von Robinson et al. stellt dagegen eine Schlüsselpublikation dar, da sie explizit das SOS mit einer wöchentlichen FOLFOX-Behandlung (Oxaliplatin: 6 mg/kg KG, 5-Fluorouracil: 50 mg/kg KG, Folinsäure: 90 mg/kg KG) für insgesamt 5 Wochen in der Maus induzierte und dabei die pathophysiologischen Prozesse auf molekularer Ebene untersuchen konnte¹⁸⁴. Die geringere notwendige Dosierung von Oxaliplatin zur Induzierung des SOS im Vergleich zu den eigenen Arbeiten, lässt sich wegen der zusätzlichen Chemotherapeutika vermuten. Die Kombination der drei Chemotherapeutika stellt zwar einerseits einen Nachteil dar, da mit diesem Modell nicht eindeutig Oxaliplatin kausal mit der Entwicklung des SOS in Zusammenhang gesetzt werden kann, andererseits entspricht sie damit einem realen Modell bezüglich der klinischen Vergleichbarkeit. Ein entscheidender Nachteil beider Studien besteht in der Tatsache, dass die Versuchstiere jeweils unmittelbar nach dem Applikationszeitraum finalisiert worden sind, während in den eigenen Arbeiten erst nach dem Applikationszeitraum die vital kritische Phase der intra- und postoperativen Belastungen begann und damit der Einfluss des SOS auf die Leberregeneration beurteilt werden kann. Des Weiteren wurden die Tiere in beiden Arbeiten nicht mit einem zusätzlichen VEGF-Inhibitor behandelt.

Alle weiteren tierexperimentellen Arbeiten zur Untersuchung des SOS basieren auf eine SOS-Induktion durch MCT im Rattenmodell und stellen damit eine wesentliche Schwäche bezüglich der klinischen Translation und Vergleichbarkeit dar^{177,191,194,200}. Das MCT-Modell stellt, nach Einmalgabe von MCT wenige Tage vor der Operation, eine akute Schädigung der Leber dar. Sowie das SOS jedoch als eine chronische Schädigung als Folge einer langfristigen Chemotherapie-Behandlung mit Oxaliplatin charakterisiert ist, lassen sich in diesem Modell histopathologische Veränderungen und damit einhergehend molekulare Mechanismen, die zum SOS führen, nur eingeschränkt beurteilen¹⁸⁴. Beispielsweise wurden im MCT-Modell histopathologisch lobuläre, inflammatorische Infiltrate in der Leber sowie die Entwicklung pulmonaler

Hypertonien beschrieben, während beide Beobachtungen bisher nicht bei Patienten mit Oxaliplatin-induzierten SOS dokumentiert worden sind^{133,143,155,221,222}. Im Vergleich zu den Mausmodellen von Keizmann et al. und insbesondere Robinson et al., stellt das MCT-Modell in der Ratte jedoch eine sichere Möglichkeit im Sinne der Reproduzierbarkeit zur Untersuchung der Leberregeneration dar, da hier alle genannten Studien die Leberregeneration sicher beurteilen konnten (bis zu maximal sieben Tage postoperativ). Diese in der vorliegenden Arbeit kritischste Phase des Protokolls mit einer hohen Mortalität, scheint im Vergleich mit der geringeren Mortalität in den tierexperimentellen MCT-Studien sicher durchführbar zu sein und ist diesbezüglich als Vorteil zu werten.

Neben der Dosisfindung von Oxaliplatin zur Induzierung des SOS stellte die nachfolgende Dosisfindung einer zusätzlichen Gabe des murinen VEGF-AK die zweite, entscheidende Zielsetzung der vorliegenden Arbeit dar. Während eine Meta-Analyse aus dem Jahr 2016 (> 76 % Oxaliplatin-basierte Therapieregime) bereits gezeigt hat, dass die zusätzliche Therapie mit Bevacizumab die Inzidenz des SOS signifikant reduziert¹²⁰, liegt zur dieser klinischen Beobachtung bisher nur eine tierexperimentelle Arbeit von Jafari et al. in einem MCT-Modell in der Ratte vor²²³. Dieser Hintergrund der mangelnden Untersuchungen eines möglichen, protektiven Effektes von Bevacizumab auf die Entwicklung des SOS bildete die primäre Fragestellung der zweiten Versuchsreihe, in der die ausschließliche Behandlung mit Oxaliplatin gegenüber der einer Behandlung mit dem zusätzlichen VEGF-AK in einer großen Kohorte verglichen wurde. Da Bevacizumab bereits als VEGF-AK für Patienten zugelassen ist und verwendet wird, ist ein besseres Verständnis in diesem Kontext von großer klinischer Relevanz. In den drei Versuchsgruppen der ersten Versuchsreihe (Gruppen 11, 12, 13) konnte differenziert herausgestellt werden, dass die zusätzliche Dosis von 10 mg/kg des murinen VEGF-AK die optimale Dosierung für die Untersuchungen der zweiten Versuchsreihe darstellt. Es hat sich gezeigt, dass mit dieser Dosierung keines der Versuchstiere ein SOS entwickelte, bei einem vergleichbaren Gewichts- und Komplikationsverlauf im Vergleich zu den Versuchstieren, die mit der höheren Dosierung von 15 mg/kg KG behandelt wurden, während in jeweils beiden Behandlungsgruppen ein Versuchstier verstorben ist. Dagegen hat sich deutlich gezeigt, dass die geringste Dosierung von 5 mg/kg KG nicht für einen protektiven Effekt ausreichend gewesen ist, da in dieser Gruppe zwei

von drei Tieren sinusoidale Dilatationen entwickelten und nur eines der insgesamt drei Tiere den gesamten Versuchsdurchlauf überlebte. Robinson et al. hatten in ihrer Schlüsselpublikation lediglich eine erhöhte VEGF-Expression im Blutserum der Mäuse demonstrieren können, die ein SOS nach FOLFOX-Behandlung entwickelten¹⁸⁴, wie es auch zuvor bereits in klinischen Studien bei Patienten demonstriert werden konnte²²⁴. Lediglich Jafari et al. untersuchten 2018 in einem Rattenmodell des MCT-induzierten SOS die Veränderungen bei zusätzlicher, einmaliger Gabe eines VEGF-AK²²³. Jedoch wurde in der Arbeit unerwartet eine erhöhte Inzidenz des SOS nach zusätzlicher Einmalgabe des VEGF-AK beobachtet. Wie zuvor erläutert, lässt sich das MCT-induzierte SOS-Modell aus den genannten Gründen sehr schlecht mit der realen klinischen Behandlung vergleichen, umso mehr mit einer Einmalgabe eines VEGF-AK im Tiermodell. Daher lassen sich aus dieser Studie keine relevanten, translationalen Schlussfolgerungen ziehen. Es zeigt vielmehr eindrücklich die Notwendigkeit eines differenzierten und praxisnahen Grundlagenmodells, wie es die vorliegende Arbeit darstellt und in der ersten Versuchsreihe etabliert werden konnte.

Zusammenfassend konnte in der ersten Versuchsreihe ein Tiermodell etabliert werden, um sowohl das SOS durch Oxaliplatin zu induzieren, als auch den Effekt einer zusätzlichen Therapie mit einem VEGF-AK zu untersuchen. Die jeweilige Dosis und Anzahl der Applikationen konnten hierfür bestimmt werden. Insbesondere vor dem Hintergrund einer 2/3-Leberteilresektion, die im Hinblick auf das Überleben als kritischste Phase innerhalb des Protokolls zu sehen ist und ein differenziertes, perioperatives „Setting“ (hierbei sind v. a. zu nennen: Ernährungsstatus, „Temperatur-Management“, Narkose- und Schmerztherapie, Operationstechniken) notwendig machte, das neben der eigentlichen Dosisfindung etabliert werden konnte. Diese differenzierte, schrittweise methodische Herangehensweise, unter Berücksichtigung der kritischen perioperativen Rahmenbedingungen, stellt eine wesentliche Stärke der vorliegenden Arbeit dar. Dagegen ist die tierschutzbedingte geringe Anzahl an Versuchstieren und damit mangelnde, statistische Aussagekraft als kritisch anzusehen, da die darauffolgende, zweite Versuchsreihe mit einer weitaus höheren Versuchstieranzahl auf diese Etablierungsarbeiten maßgeblich aufbaute.

Schließlich konnte ein Kleintiermodell etabliert werden, das im Vergleich zum bisherigen Stand der Literatur den klinischen Hintergrund realer widerspiegelt und (1.) das SOS durch Oxaliplatin induzierte, (2.) den Effekt einer VEGF-Therapie untersuchen kann und (3.) den Einfluss auf die Leberregeneration nach Leberteilresektion zu evaluieren ermöglicht. Damit stellt die erste Versuchsreihe einen wertvollen Beitrag für die zukünftige Entwicklung der insgesamt sehr komplexen Therapieoptimierung von Patienten mit KRLM dar. Es konnte ein Modell präsentiert werden, um klinische Beobachtungen präklinisch besser zu untersuchen und verstehen zu können.

4.2 Diskussion der weiteren Ergebnisse

4.2.1 Histopathologische Untersuchungen der zweiten Versuchsreihe

Basierend auf den Ergebnissen der ersten Versuchsreihe konnten in der zweiten Versuchsreihe mit insgesamt 196 Versuchstieren die beiden Therapien Oxaliplatin (Versuchsgruppe 14) gegenüber Oxaliplatin mit dem VEGF-AK (Versuchsgruppe 15), sowie drei Kontrollgruppen, schließlich verglichen werden. Damit wurde erstmals die Wirkung eines VEGF-AK auf das Oxaliplatin-induzierte SOS im Mausmodell untersucht und miteinander verglichen. Zunächst konnten die beiden Kontrollgruppen (Versuchsgruppe 16: Ausschließlich Behandlung mit dem VEGF-AK und Versuchsgruppe 17: Behandlung mit Glucose 5 %), an die nach der Therapie jeweils die Leberteilresektion erfolgte, eindeutig zeigen, dass sich in keinem der Versuchstiere das SOS entwickelte. Lediglich in der (Kontroll-) Versuchsgruppe 18, die ebenfalls eine Therapie mit Glucose 5 % beinhaltete, jedoch anschließend die Sham-Operation folgte, zeigten erstaunlicherweise 20 % der Tiere sinusoidale Dilatationen auf. Diese Beobachtung lässt sich nicht erklären, da in dieser Versuchsgruppe identische histopathologische Ergebnisse wie in der Versuchsgruppe 17 zu erwarten waren. Die zusätzliche Sham-Operation galt vielmehr dem Vergleich der weiteren Untersuchungen (v. a. laborchemische Analysen, PCR und Luminex), um herauszufinden, ob die perioperative Behandlung als solche zu Veränderungen der Leberfunktion- und regeneration bzw. zu weiteren molekularbiologischen Veränderungen führt. Diese Beobachtungen werden sich in Zukunft nur mit Wiederholungen der Versuchsreihe weiter aufklären lassen, die aufgrund des Tierschutzgesetzes in der vorliegenden Arbeit nicht umzusetzen waren. Die Auswertung der beiden Therapiearme (Versuchsgruppen 14 und 15) bestätigte,

wie bereits in der ersten Versuchsreihe beobachtet, die intra- und postoperative Behandlung als kritischste und herausforderndste Phase des Versuchsprotokolls. Während präoperativ nur wenige Versuchstiere verstarben (6,67 % bzw. 12,96 %), zeigten sich hohe intra- und insbesondere postoperative Mortalitätsraten, so dass schließlich nur 41,7 % bzw. 27,8 % den Endpunkt der Finalisierung erreicht haben. Hierzu muss angemerkt werden, dass nach dem ersten Durchlauf von jeweils 30 Versuchstieren pro Behandlungsgruppen eine Erweiterung um erneut 30 (Gruppe 14) bzw. 24 (Gruppe 15) Versuchstiere seitens der örtlichen Tierschutzbehörde nur unter der Voraussetzung gestattet wurde, Versuchstiere bei einem präoperativen Gewicht von unter 24 g nach der Leberteilresektion noch unter Narkose direkt zu finalisieren und damit vor der Belastung der postoperativen Phase zu schützen. Der Grenzwert basierte, wie zuvor beschrieben, auf den Auswertungen der ersten Versuchsreihe. Dies stellt einen weiteren Grund für die geringe Anzahl an finalisierten Versuchstieren dar und erklärt ebenfalls den (scheinbar) hohen Anteil der intraoperativ verstorbenen Versuchstiere.

Schließlich führte der direkte Vergleich der beiden Behandlungsgruppen zu keinem signifikanten Unterschied in der Entwicklung des SOS. Zwar entwickelten die Versuchstiere in der Versuchsgruppe 14 (Oxaliplatin) in absoluten Zahlen häufiger das SOS (66,7 %), im Vergleich zu der Versuchsgruppe 15 (Oxaliplatin + VEGF-AK) mit 55,6 %, reichte dies jedoch zu keinem signifikanten Ergebnis. Damit wurde die zentrale Hypothese, dass die zusätzliche Behandlung mit einem VEGF-AK protektiv auf die Entwicklung eines Oxaliplatin-induzierten SOS wirkt, zunächst widerlegt. Da es jedoch keine vergleichbaren Studien gibt, ist das Ergebnis kritisch und als nicht endgültig zu betrachten. Hierbei seien folgend die wichtigsten Kritikpunkte genannt: Zunächst stellte die histopathologische Analyse des Pathologen eine methodische Herausforderung dar, da zunächst anhand der ersten Ergebnisse des ersten Versuchsdurchlaufes, sowie im Vergleich zu humanen Proben mit SOS aus dem Institut für Pathologie der Charité, Merkmale der unterschiedlichen Ausprägungen/Schweregrade sinusoidaler Dilatationen festgelegt werden mussten, um so vergleichbare Referenzwerte zu etablieren. Daneben ließen sich auch die weiteren etablierten Charakteristika des SOS (Rubbia-Brandt et al.), wie beispielsweise hepatozelluläre Schädigungen, perisinusoidale Einblutungen, Fibrose, Steatohepatitis oder venöse Läsionen wiederkehrend erkennen^{143,144}. Jedoch zeigten

sich bei diesen zusätzlichen Werten keine Korrelationen zu der Ausprägung der sinusoidalen Dilatationen und stellten sich im Mausmodell als häufig vorkommende Erscheinungen einer Leberschädigung und somit als wenig spezifisch dar. Zusätzlich stand bis dato nur die Studie von Robinson et al. als Vergleich zur Verfügung (FOLFOX-induzierte SOS im Mausmodell), die ebenfalls primär die sinusoidalen Dilatationen als histopathologisches Merkmal für die Auswertung verwendeten und lediglich zusätzlich die Beurteilung der Unterbrechungen der endothelialen Membran („endothelial disruption“) in die Auswertung (separat) mit einschlossen¹⁸⁴. Hierbei ist zu beachten, dass in der genannten Arbeit mit neun behandelten Versuchstieren alle Versuchstiere nach der Klassifikation nach Rubbia-Brandt et al. ausschließlich milde Ausprägungen (Grad 1 von maximal 3) aufzeigten. Vor diesem Hintergrund haben wir zur Validierung unserer Ergebnisse Kontakt mit den Autoren dieser bisher einzigen murinen Studie des FOLFOX-induzierten SOS aufgenommen und repräsentative Schnittbilder mit der für die pathologische Auswertung der Studie verantwortlichen Pathologin Dr. Dina Tiniakos („Honorary Consultant Histopathologist“ der „Newcastle University“, Großbritannien) im Austausch mit unseren verantwortlichen Pathologen bewerten lassen¹⁸⁴. Im Rahmen des Austausches wurden unsere histopathologischen Beobachtungen bestätigt sowie eindeutige Ausprägungen unserer Präparate im Sinne eines SOS positiv hervorgehoben. Im Vergleich zu den relevanten, retrospektiven Studien bei Patientenkohorten, in der bei bis zu 54 % der Biopsien moderate bis schwere SOS-Charakteristika aufgezeigt werden konnten, ist die pathologische Ausprägung im Kleintiermodell nach unseren Erkenntnissen nicht direkt vergleichbar und im humanen Vergleich mit geringeren Ausprägungen als analog zu bewerten¹⁴⁴. Zwar konnten wir auch in der vorliegenden Arbeit teilweise moderate und schwere Ausprägungen beobachten, diese waren jedoch mit höheren Mortalitätsraten in Verbindung zu setzen. Diese Beobachtungen zeigten deutlich, dass die hepatotoxischen Nebenwirkungen im Mausmodell als sehr viel kritischer und lebensbedrohlicher einzuordnen sind, als dies beim Menschen der Fall ist.

Zusammenfassend lässt sich positiv hervorheben, dass die Erkenntnisse der histopathologischen Auswertung mit der bisher einzig einschlägigen Arbeit im Mausmodell von Robinson et al. vergleichbar sind, jedoch eine sehr viel höhere Fallzahl darbieten¹⁸⁴. Dennoch sind weitere Arbeiten im Mausmodell notwendig, um

Aufschluss zu geben, inwieweit die bisherige SOS-Klassifikation für humane Biopsien auf ein Kleintiermodell zu übertragen sind. Wie zuvor berichtet, wurde bisher lediglich von Jafari et al. im Jahr 2018 eine Arbeit publiziert, in der erstmalig in einem MCT-induzierten SOS-Modell bei Ratten die Wirkung eines zusätzlichen VEGF-AK untersucht wurde²²³. Zwar war die Versuchsgruppe, die den VEGF-AK erhalten hat, mit einer Gesamtanzahl von 20 Tieren vergleichsweise gering, jedoch kam es zu dem unerwarteten Ergebnis einer höheren Inzidenz von SOS in dieser Behandlungsgruppe. Diese Ergebnisse zeigen die Notwendigkeit von weiteren systematischen Untersuchungen, beispielsweise einer Adaptierung der histopathologischen Beurteilung/Merkmale für Kleintiere, um die bisher unklare Wirkung eines VEGF-AK auf die Entwicklung des SOS besser zu untersuchen.

4.2.2 Auswertung der weiteren Analysen der ersten Versuchsreihe

Neben den histopathologischen Auswertungen stellen die weiteren methodischen Untersuchungen einen wesentlichen Beitrag zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden, pathophysiologischen Veränderung bei der Entwicklung eines SOS dar, sowie dessen Auswirkungen auf die Leberfunktion- und regeneration. In der vorliegenden Arbeit werden ausschließlich die statistischen Auswertungen der weiteren methodischen Untersuchungen der ersten Versuchsreihe betrachtet.

Eine zentrale Bedeutung im Hinblick des klinischen Hintergrundes nimmt die Analyse der Leberregeneration ein, da diese nach ausgedehnter Leberteilresektion für ein erfolgreiches Langzeitüberleben eine obligate Notwendigkeit darstellt. Die aktuellen Grenzwerte einer chirurgischen Resektabilität von bis zu 80 % des Leberparenchyms setzen zwingend ein verbleibendes, gesundes Leberparenchym voraus, da die postoperative Leberregeneration nur dann das Überleben des Patienten sichert^{41,45,56}. Dies begründet die Relevanz einer niedrigen Chemotherapie-assoziierten Hepatotoxizität. Aufgrund der kleinen Versuchsgruppen und der hohen Ausfallquote war eine statistische Auswertung mittels immunohistochemischer Färbung mit den Regenerationsparametern Ki-67 und BrDu in der ersten Versuchsreihe nicht möglich. Jedoch konnte die Methodik nach diversen Adaptationen einzelner Arbeitsschritte des initialen Herstellerprotokolls erfolgreich etabliert werden, so dass eine Auswertung der zweiten Versuchsreihe mit einer entsprechend großen Kohorte erfolgen kann. In Studien des MCT-induzierten SOS

im Rattenmodell konnte mehrfach anhand der Methodik gezeigt werden, dass die Entwicklung eines SOS signifikant mit einer eingeschränkten Leberregeneration korreliert^{191,194}. Die Auswertungen der zweiten Versuchsreihe werden insbesondere von großem Interesse sein, da in den retrospektiven klinischen Studien keine eindeutigen Ergebnisse von SOS-bedingten, postoperativen Komplikationsraten und deren kausalen Zusammenhang zu potenziell veränderten Leberregenerationskapazitäten hergestellt werden konnte, wenn auch die aktuelle Studienlage eine starke Korrelation aufzeigt^{133,160}. Des Weiteren stellt die relative Messung des Lebergewichtes (postoperative Leberhypertrophie im Verhältnis des Lebergewichtes bei Operation) eine einfache, wenn auch weniger spezifische, Methode zur Messung der Leberregeneration dar und wurde bereits in vielen Studien angewandt¹⁹⁴. In der ersten Versuchsreihe konnten hierzu noch keine signifikanten Ergebnisse produziert werden. Im Hinblick prädiktiver Faktoren wurde in klinischen Studien eine Assoziation des Oxaliplatin-induzierten SOS mit einer Splenomegalie beschrieben, sowie wiederum einer Reduktion der Splenomegalie bei zusätzlicher VEGF-Inhibition mit Bevacizumab^{225,226}. Vor diesem interessanten Hintergrund, als auch als klinisch einfach umzusetzende Methode, wurde das relative Milzgewicht (im Verhältnis zum Körpergewicht) nach der Finalisierung berechnet. Auch hier konnten in der ersten Versuchsreihe keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstieren mit und ohne SOS gemessen werden.

Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des SOS mit Hinblick auf die therapeutische Einflussnahme einer VEGF-Inhibition durch Bevacizumab stellen die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren („VEGF-Familie“) dar. Innerhalb dieser Gruppe bildet VEGF-A den wichtigsten Faktor (weitere Faktoren sind: VEGF-B, -C, -D) und bindet an die beiden Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 (jeweils Tyrosinkinasen)²²⁷. Robinson et al. konnten in ihrem Mausmodell erstmalig eine erhöhte Expression von VEGF-A (und VEGF-C) in der Leber als auch im Blutserum zeigen¹⁸⁴. In der ersten Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von VEGF-A, -R1 und -R2 in der Leber mittels der PCR-Technik gemessen, sowie zusätzlich die Expression von VEGF im Blutserum mittels der Luminex Multiplex Assay Methode. Alle genannten Messungen haben keine signifikanten Ergebnisse aufgezeigt (jeweils zwischen den Versuchstieren, die das SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten). Jedoch ist hierbei anzumerken, dass es sich um

Versuchstiere aller verschiedenen Therapieregime in der ersten Versuchsreihe handelt und damit sehr heterogenen Behandlungsgruppen mit einer insgesamt kleinen Fallzahl. Allerdings zeigten die Vergleiche von VEGF-A (PCR) und VEGF (Luminex-Methode) insgesamt bereits Tendenzen einer höheren Expression bei Auftreten des SOS. Vergleicht man hierbei die publizierten Ergebnisse aller bisher MCT-induzierten SOS-Studien, konnten in einigen dieser Studien - ähnlich zu der von Robinson et al. - höhere Expressionsraten in der VEGF-Signalkaskade bei Induzierung des SOS detektiert werden^{191,223}, während einige wenige Arbeiten dagegen von keinen Veränderungen berichteten¹⁹⁴. Ähnlich kontrovers sind die Beobachtungen in Leberbiopsien von Patientenstudien, die beispielsweise von einer signifikanten Erhöhung von VEGF-C und -D berichten konnten, jedoch von keinen relevanten Veränderungen in der Expression von VEGF-A und -B^{224,228}. Die offenkundig noch uneinheitlichen Ergebnisse zeigen die Komplexität der zugrundeliegenden Pathomechanismen des SOS sowie die Notwendigkeit weiterer, differenzierterer Untersuchungen, um zu zeigen, inwiefern Bevacizumab als VEGF-AK einen positiven (protektiven) Effekt auf die Entwicklung des SOS bewirken könnte.

Des Weiteren stellt in der Pathogenese des SOS die Schädigung der Sinusoidalen Endothelzellen aufgrund einer Depolymerisation des Zytoskelett-Strukturproteins F-Actin, folgend der Zellstrukturverlust der Endothelzellen, einen initialen und entscheidenden Schritt dar¹⁷⁷. In diesem Zusammenhang wurde bereits früh MMP-9 als wichtiges Enzym charakterisiert, das u. a. physiologisch in der Embryogenese, Wundheilung oder auch Zell-Migration eine aktive Rolle einnimmt²²⁹. Interessanterweise wird dessen Expression mitunter durch eine erhöhte Aktivität des VEGF-Systems hochreguliert¹⁹⁰. Eine erhöhte MMP-9 Aktivität führt in der Pathogenese des SOS anschließend zu einem Abbau der Sinusoidalen Endothelzellen (abluminale Seite)¹⁸⁰. Eine erhöhte MMP-9 Aktivität konnte sowohl im Mausmodell von Robinson et al. als auch mehrfach in den MCT-induzierten SOS Modellen gezeigt werden^{184,223}. In Patientenstudien konnte ebenfalls eine erhöhte Expression des nahen verwandten Enzyms MMP-2 bei Entwicklung des SOS beschrieben werden²²⁸. In der vorliegenden Arbeit war in der ersten Versuchsreihe kein signifikanter Unterschied in der Expression von MMP-9 im Blutserum messbar (Luminex-Methode). Dennoch stellt dessen Messung in der zweiten Versuchsreihe

weiterhin einen Parameter von außerordentlichem Interesse dar. Als Regulationsmechanismus werden Matrix-Metalloproteinasen von endogenen „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) inhibiert. In der ersten Versuchsreihe wurde daher als Kontrolle die Expression von TIMP-1 gemessen (Luminex-Methode), um das System der Matrix-Metalloproteinasen und damit dessen Rolle in der Pathogenese des SOS noch genauer zu differenzieren. Zwar zeigten sich auch hier zwischen den Versuchstieren, die das SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten, keine signifikanten Unterschiede in der ersten Versuchsreihe, doch zeichnete sich hierbei eine deutliche Tendenz der höheren Expression bei Entwicklung des SOS ab. Inwiefern die Ergebnisse im Widerspruch zu einer erhöhten MMP-9 Expression stehen - wie es bereits mehrfach publiziert wurde - müssen weitere Untersuchungen in der zweiten Versuchsreihe zeigen.

Im Zuge der Leberregeneration ist die Aktivität des Hepatozytenwachstumsfaktors (HGF) von entscheidender Bedeutung, dessen Expressionsaktivität auch mittels der Aktivität der molekularen VEGF-A/VEGFR-2 Kaskade erhöht wird²³⁰. Des Weiteren ist bekannt, dass Hepatozyten nach einer Leberresektion durch erhöhte Stickstoffmonoxid-Expression von Sinusoidalen Endothelzellen, ihre Sensitivität für eine HGF-Stimulation ansteigt und sich dadurch die Hepatozytenproliferation erhöht^{231,232}. Auch hier konnte in den Messungen von HGF in der ersten Versuchsreihe bei Auftreten des SOS kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Da bisher ausschließlich Modelle des MCT-induzierten SOS die Leberregeneration bestimmt haben, jedoch hierbei keine Daten der HGF-Expression beschrieben wurden, stellt dieser Parameter einen vielversprechenden neuen Messwert in den weiteren Versuchsreihen dar. Neben dem HGF wurden zusätzlich die beiden Interleukine 6 und 10 (IL-6, L-10) mittels der Luminex-Methode im Blutserum gemessen, die zwar keine signifikanten Unterschiede in der ersten Versuchsreihe aufzeigten, jedoch im Falle des IL-6 eine deutliche Tendenz einer höheren Expression bei den Tieren mit Entwicklung eines SOS zu beobachten war. Beide Interleukine wurden bereits in früheren Untersuchungen bei Patienten mit SOS als Komplikation nach myeloablativer Stammzelltransplantation als signifikant erhöht beschrieben^{180,233}. Interessanterweise erhöhen gerade auch Sinusoidale Endothelzellen in inflammatorischen Phasen die Expression von IL-10 über den Notch-Signalweg und regulieren damit die Immunabwehr²³⁴. Dagegen kann IL-6 als

pro-proliferatives Zytokin betrachtet werden, sowie es über den JAK1/STAT3-Signalweg die Leberregeneration triggert²³⁵. Sowohl im Mausmodell des FOLFOX-induzierten SOS, als auch in klinischen Untersuchungen, konnten in Leberbiopsien von Patienten mit SOS eine signifikant erhöhte IL-6 Expression demonstriert werden^{184,228}. Beide Interleukine und insbesondere IL-6 sind damit für die weiteren Untersuchungen als relevante inflammatorische Parameter von Bedeutung, sowohl in den molekularen Signalwegen akuter Leberschädigungen wie dem SOS, als auch in der Induktion der Leberregeneration.

Eine weitere, interessante Beobachtung in der Pathogenese des SOS besteht in der Rolle der Hämostase. Bereits früh wurde bei Patienten nach myeloablativer Stammzelltransplantation eine erhöhte Expression des Plasminogen-Aktivator-1 (PAI-1, auf dem Serpin-E1 Gen) gemessen, dessen Funktion in der Inhibition der endogenen Fibrinolyse liegt und als möglicher prognostischer Marker analysiert und mehrfach beschrieben wurde^{180,186-188,236}. Die These, dass in der Entwicklung des SOS eine „pro-thrombotische“ Regulation seitens der endogenen Hämostase vorliegt, wurde auch von der Beobachtung unterstützt, dass Patienten, die während ihrer Behandlung regelmäßig Aspirin (irreversible Hemmung von Cyclooxygenasen und damit einer Thrombozytenaggregationshemmung) einnahmen, ein verringertes Risiko für ein SOS aufzeigten¹⁵⁹. Auch für Patienten nach myeloablativer Stammzelltransplantation konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit Defibrotid, dessen schwache profibrinolytische Aktivität das thrombo-fibrinolytische Gleichgewicht fördern soll, das Auftreten des SOS reduzierte und für diese Indikation auch als Medikament zugelassen wurde^{237,238}. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar in der ersten Versuchsreihe kein signifikanter Unterschied in der Expression von PAI-1 zwischen den Tieren, die SOS entwickelten und denen, die kein SOS entwickelten, aufgezeigt werden. Jedoch konnte bereits eine deutliche Tendenz der höheren Expression bei Entwicklung des SOS dargestellt werden. In dem FOLFOX-induzierten SOS-Mausmodell von Robinson et al. wurde bereits eine deutlich erhöhte PAI-1 Expression bei Auftreten von SOS beschrieben¹⁸⁴. Neben der Rolle von PAI-1 in der Hämostase wurde von Robinson et al. auch die Funktion von PAI-1 als Induktor in der Entwicklung von Gewebefibrose (und damit gemeinsam mit MMP-9 im Gewebeumbau) sowie in der Induktion und Instandhaltung der sogenannten replikativen Zellseneszenz („replicative senescence“) diskutiert. Dieses Phänomen,

dass Zellen den zyklischen Prozess ihrer Zellteilung pausieren, ist als Chemotherapie-Reaktion von Tumorzellen bekannt^{239,240}. Insgesamt stellt sich PAI-1 damit als multifaktorieller und sehr vielversprechender Marker in der Pathogenese des SOS dar, insbesondere in der Kaskade der Hämostase. Des Weiteren könnte er zusätzlich als Ansatzpunkt für bereits bekannte, medikamentöse Therapien dienen.

Im Hinblick der primär chronischen Leberschädigung des SOS stellen die laborchemischen Parameter AST, ALT, Albumin, Bilirubin sowie die AP zwar weniger spezifische, jedoch klinische Standardparameter dar und sind daher von grundsätzlicher Bedeutung. Bereits in der erstmaligen Beschreibung von 1920, bei der damals noch von der sogenannten „Venösen okklusiven Leberkrankheit“ gesprochen wurde, wurden abdominelle Schmerzen, Erbrechen und Aszites als klassische Untersuchungsbefunde einer Leberschädigung beschrieben¹⁴⁶. Es konnten sowohl in klinischen Untersuchungen bei Patienten mit SOS als auch im Mausmodell (FOLFOX-induziertes SOS) und Rattenmodell (MCT-induziertes SOS) deutlich erhöhte Transaminasewerte (AST, ALT) bei Vorliegen des SOS demonstriert werden^{152,184,200,241}. Diese Transaminasenerhöhungen spiegeln die ischämisch bedingten Nekrosen der Hepatozytenschädigungen wider¹⁸⁰. In den Messungen der ersten Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit reichten die Daten zwar erneut nicht aus, um signifikante Veränderungen zu beweisen, doch für beide Werte ließ sich eine deutliche Tendenz einer höheren Expression bei Auftreten des SOS darstellen. Ein weiterer Parameter der Lebersyntheseleistung stellt Albumin als wichtigstes Plasmaprotein (v. a. in Funktion als Transportprotein) dar. Dessen Messungen erbrachten in der ersten Versuchsreihe ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Aufgrund der Tatsache, dass in den tierexperimentellen Untersuchungen der bisherigen Publikationen die Messung von Albumin nicht beschrieben wurde, könnten weitere Untersuchungen von Albumin noch offene und damit neue Erkenntnisse liefern. Des Weiteren wurden in den Auswertungen der klinischen Studien das Auftreten von Aszites (pathologische Ansammlung freier Flüssigkeit in der Peritonealhöhle) und Cholestase beschrieben, also ein Rückstau von Bilirubin und weiteren Bestandteilen der Gallenflüssigkeit, dessen Ursachen grundsätzlich sowohl intra- als auch extrahepatischen Ursprungs sein können^{156,242}. Im Hinblick auf die pathophysiologische Obstruktion des Blutflusses und die Leberfunktionsstörungen bei Entwicklung eines SOS, lässt sich eine intrahepatische

Ätiologie vermuten. In den eigenen Messungen der ersten Versuchsreihe führte die Auswertung von Bilirubin zu dem stärksten Unterschied in den laborchemischen Messungen bei Tieren mit SOS, jedoch ohne statistische Signifikanz. Als weiterer Cholestaseparameter wurde laborchemisch die AP gemessen, die in den eigenen Messungen keine signifikanten Unterschiede aufwies. Sowohl die Werte von Bilirubin als auch der AP, wurden nicht im Mausmodell von Robinson et al. gemessen, jedoch konnten in den MCT-induzierten SOS-Modellen erhöhte Cholestaseparameter bzw. eine verminderte Gallensäureproduktion bei Tieren mit SOS gemessen werden^{191,200}. Auch in den klinischen Studien wurde von erhöhten Bilirubin- und AP Werten berichtet^{136,144,156}. Mögen alle der genannten, laborchemischen Parameter (AST, ALT, AP, Bilirubin, Albumin) nicht sehr spezifisch für das SOS seien, so stellen sie doch weiterhin einen unverzichtbaren Bestandteil in der Diagnostik für jeden Patienten während des gesamten Therapieverlaufes dar.

Zusammenfassend konnte im Anschluss der Etablierung des Tiermodells und der Dosisfindungsstudie die Umsetzbarkeit des Versuchsprotokolls in einer großen Kohorte der zweiten Versuchsreihe erfolgreich demonstriert werden. Hierbei ließ sich erstmalig in einem Mausmodell ein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer präoperativen Therapie mit Oxaliplatin und dem Auftreten des SOS darlegen. Zusätzlich wurde erstmalig der Effekt einer VEGF-Inhibition im Mausmodell untersucht, da bisher nur eine hohe Expression des VEGF mit der Entwicklung der SOS korreliert werden konnte. Im Vergleich zu dem Studienarm mit einer zusätzlichen VEGF-AK-Therapie, konnte in den histopathologischen Auswertungen der zweiten Versuchsreihe zwar kein signifikanter Unterschied im Auftreten des SOS, und damit kein protektiver Effekt, demonstriert werden. Die insgesamt hohe Mortalität in den beiden Oxaliplatin-basierten Behandlungsgruppen (Oxaliplatin und Oxaliplatin + VEGF-AK), die primär auf die hepatotoxischen Nebenwirkungen des Oxaliplatin zurückzuführen sind (histopathologische Untersuchungen in der ersten Versuchsreihe konnten bei hohen Dosierungen des VEGF-AK ebenfalls Leberschädigungen aufzeigen), zeigt jedoch auch die hohe Belastung der Tiere, insbesondere bei zwei aufeinanderfolgenden Injektionen pro Behandlungswoche in dem Therapiearm mit Oxaliplatin und dem VEGF-AK. Es müssen daher diverse Parameter des Versuchsprotokolls re-evaluiert werden, beispielsweise ein verlängertes Intervall zwischen der letzten Chemotherapie-/ VEGF-AK-Behandlung

und der Operation^{166,243}, geringere Dosierungen bei einem verlängerten Behandlungszeitraum, oder auch eine kritische Evaluation der bisherigen Konversion humaner, histopathologischer SOS Kriterien auf tierexperimentelle Studien. Somit stellen diese Untersuchungen zunächst erste, wichtige Erkenntnisse dar, auf deren Grundlage weitere Analysen sowie neue, adaptierte und erweiterte Versuchsreihen folgen müssen. Neben den histopathologischen Auswertungen konnten die weiteren Ergebnisse der umfangreichen Methoden in der ersten Versuchsreihe zwar keine signifikanten Ergebnisse aufweisen. Diese Tatsache lässt sich v. a. auf die heterogenen Behandlungsgruppen, die jeweils gepaart verglichen wurden (im Vergleich jeweils alle Versuchstiere mit Entwicklung des SOS versus ohne Entwicklung des SOS), sowie auf die insgesamt kleine Fallzahl zurückführen. Jedoch zeigten sich bereits erste interessante Tendenzen in den komplexen, pathophysiologischen Zusammenhängen des SOS. Besonders hervorzuheben ist der Umfang der diversen Untersuchungstechniken. Im Hinblick auf die Vielzahl an bisher publizierten Hypothesen zu der Pathogenese des SOS, erlauben die hier etablierten Untersuchungstechniken eine umfassende, weitergehende Analyse aus unterschiedlichen Perspektiven.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die multimodale Therapie KRLM stellt eine komplexe interdisziplinäre Herausforderung dar. Diese Komplexität spiegelt sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Studie wider. Im Hinblick auf das übergeordnete primäre Ziel eine chirurgische Resektion als einzige kurative Therapieoption zu ermöglichen, kommt der neoadjuvanten Chemotherapie eine entscheidende Rolle zu. Damit einhergehend ist die Chemotherapie-assoziierte Hepatotoxizität von zunehmender, klinischer Relevanz. Diese Bedeutung zeigt sich in der steigenden Anzahl an Publikationen, sowohl humaner als auch (tier-) experimenteller Studien. Das Oxaliplatin-assoziierte SOS wurde in retrospektiven Patientenstudien klinisch, histopathologisch sowie auch molekularbiologisch bereits umfassend beschrieben und dessen klinische Komplikationen in den entsprechenden Fachgesellschaften aufmerksam zur Kenntnis genommen. Darüber hinaus ist die Beobachtung eines protektiven Effektes bei zusätzlicher Therapie mit Bevacizumab als VEGF-AK von besonderem (klinischen) Interesse. Vor diesem Hintergrund wurden vermehrt (tier-)

experimentelle Studien mit dem Ziel der klinisch-experimentellen Translation durchgeführt, um ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden pathophysiologischen Zusammenhänge zu erlangen. Das häufigste Modell, das auch die wichtigsten Grundlagen bis heute geliefert hat, stellt das MCT-induzierte SOS-Modell in der Ratte dar. Die Stärken des Modells liegen in der guten Reproduzierbarkeit, der geringen Störanfälligkeit bei einmaliger MCT-Gabe und der Möglichkeit einer anschließenden, sicheren perioperativen Behandlungsmöglichkeit (ausgedehnte Leberteilresektion) aufgrund der robusten Belastbarkeit der Tierart. Aufgrund des jedoch weitestgehend artifiziellen Tiermodells eines MCT-induzierten SOS wurde von Robinson et al. 2013 erstmalig das SOS durch eine FOLFOX-Behandlung im Mausmodell etabliert und dabei eine erhöhte VEGF-Expression bei Auftreten des SOS festgestellt. Auf dieser Grundlage stellt die vorliegende Arbeit eine Weiterentwicklung dar, in der (zum aktuellen Kenntnisstand) erstmalig gezeigt werden konnte, dass spezifisch Oxaliplatin das SOS in der Leber induziert. Es wurde eine dezidierte Vorgehensweise etabliert, einschließlich histopathologischer, immunhistochemischer, laborchemischer und molekularer Untersuchungsmethoden (Expressionsanalysen in der Leber mittels PCR, als auch im Blutserum mittels der Luminex-Methode), die als Grundlage für weiterführende Analysen dienen. Erstmals wurde in einem Chemotherapie-induzierten SOS Modell in der Maus die Behandlung mit Oxaliplatin im Vergleich zu einer zusätzlichen Therapie mit einem (murinen) VEGF-AK untersucht, um die bisherigen klinischen Studien tierexperimentell evaluieren zu können. Auch wenn in diesen ersten Analysen keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich dargestellt werden konnten, stellen sie eine wichtige Grundlage für weitergehende Adaptationen innerhalb des Modells dar, als auch für Erweiterungen im Sinne einer klinischen Translation. Des Weiteren wäre es von Interesse, die Rolle des oxidativen Stresses, der pro-thrombotischen Aktivität sowie der Interaktion des Gerinnungssystems mit der Remodellierung der extrazellulären Matrix weitergehend zu betrachten, wie es u. a. auch Robinson et al. propagiert¹⁸⁴.

Im weiteren Verlauf würde insbesondere die Entwicklung eines Tumormodells eine anspruchsvolle, jedoch sehr zielführende Fortführung des Versuchsprotokolls darstellen. Hintergrund ist die Bedeutung der veränderten Tumorumgebung („tumor environment“), dessen Einfluss auf das Therapieansprechen eine wichtige Determinante ist und in der vorgestellten Arbeit nicht eingeschlossen werden konnte.

In diesem Kontext spielt nicht nur die toxische Wirkung von Oxaliplatin auf die Lebermetastasen eine Rolle, sondern insbesondere auch der interagierende Effekt einer VEGF-Inhibition. Dessen positiver Effekt auf das Langzeitüberleben bei Patienten mit KRLM konnte mehrfach ermittelt werden, während beispielsweise ein positiver Effekt durch Bevacizumab bei Lebermetastasen eines Mammakarzinoms als Primarius bisher weniger deutlich in Studien (im Vergleich zu KRLM) dargestellt werden konnte, so dass die Wirkung einer VEGF-Inhibition noch als unzureichend geklärt betrachtet werden muss^{244,245}. Hierzu wurde u. a. in einer bedeutenden Publikation beschrieben, dass KRLM drei unterschiedliche histopathologische Charakteristika der Vaskularisation aufzeigen. Darunter fusionieren Metastasen bei ca. 40 % der Fälle im Zuge des sogenannten „Vessel Co-Option“ mit bereits bestehenden Gefäßen des gesunden Leberparenchyms, so dass keine (Neo-) Angiogenese im eigentlichen Sinne notwendig ist²⁴⁶. Diese individuelle Tumorbilogie konnte als klinisch signifikanter Resistenzmechanismus gegenüber Bevacizumab als VEGF-Inhibitor entschlüsselt werden, unter dem Patienten nicht von einer Therapie mit Bevacizumab profitieren, sondern stattdessen der Tumorprogress fortschreiten kann. Anhand dieses Beispiels zeigt sich die Komplexität der medikamentösen Tumor- und insbesondere Metastasen-Therapie und die Bedeutung einer präzisen Patientenselektion für die Therapieentscheidung^{243,247}.

Neben dem Ziel der Reduzierung des SOS durch eine verbesserte medikamentöse Therapie nimmt auch die Untersuchung prädiktiver Faktoren eine klinisch relevante Rolle ein, die in Studien unmittelbar umzusetzen wäre. Es wurden bereits zur prädiktiven Diagnostik des SOS nach myeloablativer Stammzelltransplantation diverse Parameter dahingehend untersucht (neben laborchemischen Werten auch Plasmaproteine, u. a. Interleukine und PAI-1), von denen sich ausschließlich hohe AST-Werte von über 750 U/l als Marker für eine insgesamt schlechte Prognose bei Patienten mit SOS herausstellte^{152,241}. Im Jahr 2010 konnte erstmalig in einem Patientenkollektiv (n= 78), welches mit Oxaliplatin basierten Chemotherapieregimen bei KRLM behandelt wurde, mit dem sogenannten „APRI Score“ (eine Formel, die nur die AST und Thrombozytenzahl einschließt) ein prädiktiver Wert für das Auftreten eines hochgradigen SOS vorgestellt werden, der konsekutiv mit einer höheren postoperativen Leberfunktionsstörung korreliert werden konnte¹⁹³.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit eine wichtige Grundlage für die klinisch-experimentelle Translation des Oxaliplatin-assoziierten SOS und dessen Auswirkungen auf die Leberregeneration nach Leberteilresektion. Es wird nach aktuellem Kenntnisstand erstmalig demonstriert, dass Oxaliplatin das SOS induziert. Hierzu wurde ein Tiermodell etabliert, in dem eine VEGF-AK-Therapie verglichen werden kann und die pathophysiologischen Zusammenhänge in der Entwicklung des SOS differenziert analysiert werden können. Im Zuge der weiteren Optimierung könnte eine spezifischere Optimierung des Tiermodells notwendig sein, um die Mortalität zu reduzieren und eine bessere Aussagekraft in der Auswertung zu erzielen. Anschließend könnte im Sinne der Translation kohärent ein Tumormodell entwickelt werden, um die klinischen Bedingungen und molekularen Mechanismen realistischer darzustellen. Je weiter die chirurgischen Grenzen der Resektabilität erweitert werden und damit ein größtmöglicher Tumorbefall noch reseziert werden kann, desto mehr Bedeutung kommt dem Schutz des verbleibenden, obligat gesunden Leberparenchyms im Zuge einer neoadjuvanten Chemotherapie zu, um die lebensnotwendige postoperative Leberregeneration zu ermöglichen. Die vorgestellten experimentellen Untersuchungen und Vorhaben stellen eine wichtige Grundlage zum besseren Verständnis von der Entwicklung, Pathophysiologie und Präventionsmöglichkeit des Oxaliplatin-induzierten SOS dar und ermöglichen damit eine Verbesserung der Therapie für Patienten mit KRLM.

5. Zusammenfassung

Das KRK stellt eines der häufigsten Tumorleiden für beide Geschlechter dar. Etwa die Hälfte aller Patienten entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung KRLM. Im Rahmen der multimodalen Therapie kommt der neoadjuvanten Chemotherapie eine zunehmend hohe Bedeutung zu. Diese basiert zu einem großen Anteil auf dem Platinderivat Oxaliplatin, das mit dem Auftreten des SOS assoziiert ist und folglich mit einer höheren Rate an intra- und postoperativen Komplikationen sowie einer höheren Mortalität einhergeht. Erste Patientenstudien konnten eine verringerte Inzidenz des SOS aufzeigen, wenn die Patienten zusätzlich mit dem VEGF-AK Bevacizumab behandelt worden sind. Diese Arbeit wurde durchgeführt, um ein Tiermodell zu etablieren, das diesen klinischen Hintergrund in ein experimentelles Modell translatiert. Für die Etablierung und erste Vergleichsstudien wurden in zwei Versuchsreihen insgesamt 235 Mäuse behandelt und operiert. Es konnte erstmalig im Tiermodell gezeigt werden, dass Oxaliplatin das SOS induziert. Des Weiteren wurde erstmalig ein Modell präsentiert, in dem anschließend eine 2/3-Lebenteilresektion durchgeführt werden konnte, um den Einfluss des SOS auf die Leberregeneration zu untersuchen. In diesen ersten Versuchsabläufen konnte kein protektiver Effekt durch die zusätzliche Behandlung mit einem VEGF-AK nachgewiesen werden. Das vorgestellte Tiermodell ermöglicht umfassende histopathologische, immunhistochemische, laborchemische sowie molekulare Expressionsanalysen diverser Parameter, um die zugrundeliegenden pathophysiologischen Zusammenhänge besser zu verstehen. Erste Analysen innerhalb der ersten Versuchsreihe konnten hierzu noch keine signifikanten Messwerte aufzeigen, jedoch Tendenzen darstellen, beispielsweise eine höhere VEGF-Expression bei Auftreten des SOS. Zusammenfassend stellt die Arbeit eine wichtige Weiterentwicklung in der (tier-) experimentellen Forschung für ein besseres Verständnis des SOS dar. Ziel der weiteren notwendigen Untersuchungen und Adaptierungen ist die klinische Optimierung der multimodalen Therapie von Patienten mit KRLM durch eine Verringerung der hepatischen Chemotherapie-assoziierten Nebenwirkungen. Damit könnten in Zukunft mehr Patienten die Chance auf eine Lebenteilresektion und somit auf die bisher einzige kurative Therapieoption erhalten.

6. Literaturverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten Gesamt. Robert Koch Institut. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html. Published 2014. Accessed.
2. Zentrum für Krebsregisterdaten Darm. Robert Koch Institut. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html. Published 2014. Updated 2014. Accessed.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-1403.
4. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
5. Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(2):104-117.
6. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*. 2017;3(4):524-548.
7. Dozois EJ, Boardman LA, Suwanthanma W, Limburg PJ, Cima RR, Bakken JL, Vierkant RA, Aakre JA, Larson DW. Young-onset colorectal cancer in patients with no known genetic predisposition: can we increase early recognition and improve outcome? *Medicine (Baltimore)*. 2008;87(5):259-263.
8. Ahnen DJ, Wade SW, Jones WF, Sifri R, Mendoza Silveiras J, Greenamyre J, Guiffre S, Axilbund J, Spiegel A, You YN. The increasing incidence of young-onset colorectal cancer: a call to action. *Mayo Clin Proc*. 2014;89(2):216-224.
9. Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, Berger DL. Impact of screening colonoscopy on outcomes in colon cancer surgery. *JAMA Surg*. 2013;148(8):747-754.
10. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8(12):686-700.
11. Ahnen DJ. The American College of Gastroenterology Emily Couric Lecture--the adenoma-carcinoma sequence revisited: has the era of genetic tailoring finally arrived? *Am J Gastroenterol*. 2011;106(2):190-198.
12. Institut RK. Zentrum für Krebsregisterdaten: Darm. Robert Koch Institut. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html. Published 2014. Updated 2014. Accessed.
13. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*. 1993;104(5):1535-1549.
14. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, Ukaegbu CI, Brais LK, McNamara PG, Mayer RJ, Schrag D, Meyerhardt JA, Ng K, Kidd J, Singh N, Hartman AR, Wenstrup RJ, Syngal S. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2017;35(10):1086-1095.
15. Ponz de Leon M, Sassatelli R, Benatti P, Roncucci L. Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. The 6-

- year experience of a population-based registry. *Cancer*. 1993;71(11):3493-3501.
16. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med*. 1992;326(10):658-662.
 17. Tuohy TM, Rowe KG, Mineau GP, Pimentel R, Burt RW, Samadder NJ. Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: a population-based study in Utah. *Cancer*. 2014;120(1):35-42.
 18. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 1990;323(18):1228-1233.
 19. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 2008;300(23):2765-2778.
 20. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2015;181(11):832-845.
 21. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med*. 2016;375(8):794-798.
 22. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, Negri E, Straif K, Romieu I, La Vecchia C, Boffetta P, Jenab M. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol*. 2011;22(9):1958-1972.
 23. Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, Corley DA, Tei Y, Buffler PA. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer? *Am J Gastroenterol*. 2011;106(11):1911-1921; quiz 1922.
 24. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med*. 1990;323(24):1664-1672.
 25. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, Rodriguez C, Sinha R, Calle EE. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA*. 2005;293(2):172-182.
 26. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*. 2011;6(6):e20456.
 27. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, Schootman M, Lian M, Park Y, Graubard BI, Hollenbeck AR, Sinha R. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer*. 2012;118(14):3636-3644.
 28. Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, Schootman M, Zauber AG, Hollenbeck AR, Sinha R, Allison J. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(18):1353-1362.
 29. Willett WC. Diet and cancer: an evolving picture. *JAMA*. 2005;293(2):233-234.
 30. Institut RK. Epidemiologie von Krebserkrankungen. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Epidemiologie/Kapitel2_Epidemiologie.pdf?__blob=publicationFile. Published 2016. Accessed.
 31. Brenner H, Hoffmeister M, Stegmaier C, Brenner G, Altenhofen L, Haug U. Risk of progression of advanced adenomas to colorectal cancer by age and sex: estimates based on 840,149 screening colonoscopies. *Gut*. 2007;56(11):1585-1589.

32. Moreno CC, Mittal PK, Sullivan PS, Rutherford R, Staley CA, Cardona K, Hawk NN, Dixon WT, Kitajima HD, Kang J, Small WC, Oshinski J, Votaw JR. Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. *Clin Colorectal Cancer*. 2016;15(1):67-73.
33. Moiel D, Thompson J. Early detection of colon cancer-the kaiser permanente northwest 30-year history: how do we measure success? Is it the test, the number of tests, the stage, or the percentage of screen-detected patients? *Perm J*. 2011;15(4):30-38.
34. van der Geest LG, Lam-Boer J, Koopman M, Verhoef C, Elferink MA, de Wilt JH. Nationwide trends in incidence, treatment and survival of colorectal cancer patients with synchronous metastases. *Clin Exp Metastasis*. 2015;32(5):457-465.
35. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):177-193.
36. JM J, RM G, al AEe. Colon and Rectum AJCC Cancer Staging Manual. In: Vol 8t. Amin MB (Ed), AJCC; Chicago 2017:251.
37. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, Meyer L, Gress DM¹, Byrd DR¹, Winchester DP. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-99.
38. Siriwardena AK, Mason JM, Mullamitha S, Hancock HC, Jegatheeswaran S. Management of colorectal cancer presenting with synchronous liver metastases. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(8):446-459.
39. Leporrier J, Maurel J, Chiche L, Bara S, Segol P, Launoy G. A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg*. 2006;93(4):465-474.
40. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg*. 2006;244(2):254-259.
41. Tzeng CW, Aloia TA. Colorectal liver metastases. *J Gastrointest Surg*. 2013;17(1):195-201; quiz p.201-192.
42. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, , Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, Nordlinger B, van de Velde CJ, Balmana J, Regula J, Nagtegaal ID, Beets-Tan RG, Arnold D, Ciardiello F, Hoff P, Kerr D, Köhne CH, Labianca R, Price T, Scheithauer W, Sobrero A, Tabernero J, Aderka D, Barroso S, Bodoky G, Douillard JY, El Ghazaly H, Gallardo J, Garin A, Glynne-Jones R, Jordan K, Meshcheryakov A, Papamichail D, Pfeiffer P, Souglakos I, Turhal S, Cervantes A. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol*. 2012;23(10):2479-2516.
43. Bismuth H, Castaing D, Traynor O. Surgery for synchronous hepatic metastases of colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1988;149:144-149.
44. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, Eng C, Sargent DJ, Larson DW, Grothey A, Vauthey JN, Nagorney DM, McWilliams RR. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2009;27(22):3677-3683.
45. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA. Recurrence and outcomes following hepatic resection,

- radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg.* 2004;239(6):818-825; discussion 825-817.
46. Fernandez FG, Drebin JA, Linehan DC, Dehdashti F, Siegel BA, Strasberg SM. Five-year survival after resection of hepatic metastases from colorectal cancer in patients screened by positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose (FDG-PET). *Ann Surg.* 2004;240(3):438-447; discussion 447-450.
 47. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, Balladur P, Boudjema K, Bachellier P, Jaeck D. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. *Association Française de Chirurgie. Cancer.* 1996;77(7):1254-1262.
 48. Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, Sumetchotimetha W, Rangsin R, Schulick RD, Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg.* 2002;235(6):759-766.
 49. Morris EJ, Forman D, Thomas JD, Quirke P, Taylor EF, Fairley L, Cottier B, Poston G. Surgical management and outcomes of colorectal cancer liver metastases. *Br J Surg.* 2010;97(7):1110-1118.
 50. de Jong MC, Pulitano C, Ribero D, Strub J, Mentha G, Schulick RD, Choti MA, Aldrighetti L, Capussotti L, Pawlik TM. Rates and patterns of recurrence following curative intent surgery for colorectal liver metastasis: an international multi-institutional analysis of 1669 patients. *Ann Surg.* 2009;250(3):440-448.
 51. Wei AC, Greig PD, Grant D, Taylor B, Langer B, Gallinger S. Survival after hepatic resection for colorectal metastases: a 10-year experience. *Ann Surg Oncol.* 2006;13(5):668-676.
 52. Tomlinson JS, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Fong Y, Kornprat P, Gonen M, Kemeny N, Brennan MF, Blumgart LH, D'Angelica . Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *J Clin Oncol.* 2007;25(29):4575-4580.
 53. Andres A, Majno PE, Morel P, Rubbia-Brandt L, Giostra E, Gervaz P, Terraz S, Allal AS, Roth AD, Mentha G. Improved long-term outcome of surgery for advanced colorectal liver metastases: reasons and implications for management on the basis of a severity score. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(1):134-143.
 54. Jaeck D, Oussoultzoglou E, Rosso E, Greget M, Weber JC, Bachellier P. A two-stage hepatectomy procedure combined with portal vein embolization to achieve curative resection for initially unresectable multiple and bilobar colorectal liver metastases. *Ann Surg.* 2004;240(6):1037-1049; discussion 1049-1051.
 55. Brouquet A, Abdalla EK, Kopetz S, Garrett CR, Overman MJ, Eng C, Andreou A, Loyer EM, Madoff DC, Curley SA, Vauthey JN. High survival rate after two-stage resection of advanced colorectal liver metastases: response-based selection and complete resection define outcome. *J Clin Oncol.* 2011;29(8):1083-1090.
 56. Schwarz RE, Abdalla EK, Aloia TA, Vauthey JN. AHPBA/SSO/SSAT sponsored consensus conference on the multidisciplinary treatment of colorectal cancer metastases. *HPB (Oxford).* 2013;15(2):89-90.
 57. Truant S, Huglo D, Hebbar M, Ernst O, Steinling M, Pruvot FR. Prospective evaluation of the impact of [18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography of resectable colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 2005;92(3):362-369.

58. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg.* 1999;230(3):309-318; discussion 318-321.
59. Brouquet A, Mortenson MM, Vauthey JN, Rodriguez-Bigas MA, Overman MJ, Chang GJ, Kopetz S, Garrett C, Curley SA, Abdalla EK. Surgical strategies for synchronous colorectal liver metastases in 156 consecutive patients: classic, combined or reverse strategy? *J Am Coll Surg.* 2010;210(6):934-941.
60. Aloia TA, Vauthey JN. Management of colorectal liver metastases: past, present, and future. *Updates Surg.* 2011;63(1):1-3.
61. Reddy SK, Pawlik TM, Zorzi D, Gleisner AL, Ribero D, Assumpcao L, Barbas AS, Abdalla EK, Choti MA, Vauthey JN, Ludwig KA, Mantyh CR, Morse MA, Clary BM. Simultaneous resections of colorectal cancer and synchronous liver metastases: a multi-institutional analysis. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(12):3481-3491.
62. de Haas RJ, Adam R, Wicherts DA, Azoulay D, Bismuth H, Vibert E, Salloum C, Perdigao F, Benkabbou A, Castaing D. Comparison of simultaneous or delayed liver surgery for limited synchronous colorectal metastases. *Br J Surg.* 2010;97(8):1279-1289.
63. Adam R, de Gramont A, Figueras J, Kokudo N, Kunstlinger F, Loyer E, Poston G, Rougier P, Rubbia-Brandt L, Sobrero A, Teh C, Tejpar S, Van Cutsem E, Vauthey JN, Pahlman L. Managing synchronous liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(9):729-741.
64. Mentha G, Majno PE, Andres A, Rubbia-Brandt L, Morel P, Roth AD. Neoadjuvant chemotherapy and resection of advanced synchronous liver metastases before treatment of the colorectal primary. *Br J Surg.* 2006;93(7):872-878.
65. Mentha G, Roth AD, Terraz S, Giostra E, Gervaz P, Andres A, Morel P, Rubbia-Brandt L, Majno PE. 'Liver first' approach in the treatment of colorectal cancer with synchronous liver metastases. *Dig Surg.* 2008;25(6):430-435.
66. Adam R, Lucidi V, Bismuth H. Hepatic colorectal metastases: methods of improving resectability. *Surg Clin North Am.* 2004;84(2):659-671.
67. Morris-Stiff G, Gomez D, Prasad R. Quantitative assessment of hepatic function and its relevance to the liver surgeon. *J Gastrointest Surg.* 2009;13(2):374-385.
68. Vauthey JN, Chaoui A, Do KA, Bilimoria MM, Fenstermacher MJ, Charnsangavej C, Hicks M, Alsfasser G, Lauwers G, Hawkins IF, Caridi J. Standardized measurement of the future liver remnant prior to extended liver resection: methodology and clinical associations. *Surgery.* 2000;127(5):512-519.
69. Kishi Y, Abdalla EK, Chun YS, Zorzi D, Madoff DC, Wallace MJ, Curley SA, Vauthey JN. Three hundred and one consecutive extended right hepatectomies: evaluation of outcome based on systematic liver volumetry. *Ann Surg.* 2009;250(4):540-548.
70. Ribero D, Abdalla EK, Madoff DC, Donadon M, Loyer EM, Vauthey JN. Portal vein embolization before major hepatectomy and its effects on regeneration, resectability and outcome. *Br J Surg.* 2007;94(11):1386-1394.
71. Shindoh J, Truty MJ, Aloia TA, Curley SA, Zimmitti G, Huang SY, Mahvash A, Gupta S, Wallace MJ, Vauthey JN. Kinetic growth rate after portal vein embolization predicts posthepatectomy outcomes: toward zero liver-related

- mortality in patients with colorectal liver metastases and small future liver remnant. *J Am Coll Surg*. 2013;216(2):201-209.
72. Lam VW, Laurence JM, Johnston E, Hollands MJ, Pleass HC, Richardson AJ. A systematic review of two-stage hepatectomy in patients with initially unresectable colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)*. 2013;15(7):483-491.
 73. Adam R, Laurent A, Azoulay D, Castaing D, Bismuth H. Two-stage hepatectomy: A planned strategy to treat irresectable liver tumors. *Ann Surg*. 2000;232(6):777-785.
 74. Chun YS, Vauthey JN, Ribero D, Donadon M, Mullen JT, Eng C, Madoff DC, Chang DZ, Ho L, Kopetz S, Wei SH, Curley SA, Abdalla EK. Systemic chemotherapy and two-stage hepatectomy for extensive bilateral colorectal liver metastases: perioperative safety and survival. *J Gastrointest Surg*. 2007;11(11):1498-1504; discussion 1504-1495.
 75. Tsai S, Marques HP, de Jong MC, Mira P, Ribeiro V, Choti MA, Schulick RD, Barroso E, Pawlik TM. Two-stage strategy for patients with extensive bilateral colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)*. 2010;12(4):262-269.
 76. Wicherts DA, Miller R, de Haas RJ, Bitsakou G, Vibert E, Veilhan LA, Azoulay D, Bismuth H, Castaing D, Adam R. Long-term results of two-stage hepatectomy for irresectable colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg*. 2008;248(6):994-1005.
 77. Duwe G, Knitter S, Pesthy S, Beierle AS, Bahra M, Schmelzle M, Schmuck RB, Lohneis P, Raschzok N, Öllinger R, Sinn M, Struecker B, Sauer IM, Pratschke J, Andreou A. Hepatotoxicity following systemic therapy for colorectal liver metastases and the impact of chemotherapy-associated liver injury on outcomes after curative liver resection. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(9):1668-1681.
 78. Bismuth H, Adam R, Lévi F, Farabos C, Waechter F, Castaing D, Majno P, Engerran L. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg*. 1996;224(4):509-520; discussion 520-502.
 79. Andreou A, Aloia TA, Brouquet A, Vauthey JN. Recent advances in the curative treatment of colorectal liver metastases. *Gastrointest Cancer Res*. 2011;4(4 Suppl 1):S2-8.
 80. Adam R, Delvart V, Pascal G, Valeanu A, Castaing D, Azoulay D, Giacchetti S, Paule B, Kunstlinger F, Ghémard O, Levi F, Bismuth H. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg*. 2004;240(4):644-657; discussion 657-648.
 81. Tanaka K, Adam R, Shimada H, Azoulay D, Lévi F, Bismuth H. Role of neoadjuvant chemotherapy in the treatment of multiple colorectal metastases to the liver. *Br J Surg*. 2003;90(8):963-969.
 82. Alberts SR, Horvath WL, Sternfeld WC, Goldberg RM, Mahoney MR, Dakhil SR, Levitt R, Rowland K, Nair S, Sargent DJ, Donohue JH. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: a North Central Cancer Treatment Group phase II study. *J Clin Oncol*. 2005;23(36):9243-9249.
 83. Folprecht G, Grothey A, Alberts S, Raab HR, Köhne CH. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Ann Oncol*. 2005;16(8):1311-1319.
 84. Adam R, Wicherts DA, de Haas RJ, Ciaccio O, Lévi F, Paule B, Ducreux M, Azoulay D, Bismuth H, Castaing D. Patients with initially unresectable

- colorectal liver metastases: is there a possibility of cure? *J Clin Oncol*. 2009;27(11):1829-1835.
85. Masi G, Loupakis F, Pollina L, Vasile E, Cupini S, Ricci S, Brunetti IM, Ferraldeschi R, Naso G, Filipponi F, Pietrabissa A, Goletti O, Baldi G, Fornaro L, Andreuccetti M, Falcone A. Long-term outcome of initially unresectable metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil/leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) followed by radical surgery of metastases. *Ann Surg*. 2009;249(3):420-425.
 86. Delaunoy T, Alberts SR, Sargent DJ, Green E, Goldberg RM, Krook J, Fuchs C, Ramanathan RK, Williamson SK, Morton RF, Findlay BP. Chemotherapy permits resection of metastatic colorectal cancer: experience from Intergroup N9741. *Ann Oncol*. 2005;16(3):425-429.
 87. Barone C, Nuzzo G, Cassano A, Basso M, Schinzari G, Giuliante F, D'Argento E, Trigila N, Astone A, Pozzo C. Final analysis of colorectal cancer patients treated with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid neoadjuvant chemotherapy for unresectable liver metastases. *Br J Cancer*. 2007;97(8):1035-1039.
 88. Wein A, Riedel C, Köckerling F, Martus P, Baum U, Brueckl WM, Reck T, Ott R, Hänslér J, Bernatik T, Becker D, Schneider T, Hohenberger W, Hahn EG. Impact of surgery on survival in palliative patients with metastatic colorectal cancer after first line treatment with weekly 24-hour infusion of high-dose 5-fluorouracil and folinic acid. *Ann Oncol*. 2001;12(12):1721-1727.
 89. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crinò L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L, Cortesi E, Picone V, Vitello S, Chiara S, Granetto C, Porcile G, Fioretto L, Orlandini C, Andreuccetti M, Masi G. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol*. 2007;25(13):1670-1676.
 90. Takahashi T, Shibata Y, Tojima Y, Tsuboi K, Sakamoto E, Kunieda K, Matsuoka H, Suzumura K, Sato M, Naganuma T, Sakamoto J, Morita S, Kondo K. Multicenter phase II study of modified FOLFOX6 as neoadjuvant chemotherapy for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer in Japan: ROOF study. *Int J Clin Oncol*. 2013;18(2):335-342.
 91. Adam R, Aloia T, Lévi F, Wicherts DA, de Haas RJ, Paule B, Bralet MP, Bouchahda M, Machover D, Ducreux M, Castagne V, Azoulay D, Castaing D. Hepatic resection after rescue cetuximab treatment for colorectal liver metastases previously refractory to conventional systemic therapy. *J Clin Oncol*. 2007;25(29):4593-4602.
 92. Brouquet A, Andreou A, Vauthey JN. The management of solitary colorectal liver metastases. *Surgeon*. 2011;9(5):265-272.
 93. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2008;371(9617):1007-1016.
 94. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M, Jaeck D, Mirza D, Parks RW, Collette L, Praet M, Bethe U, Van Cutsem E, Scheithauer W, Gruenberger T. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC

- 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(12):1208-1215.
95. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2335-2342.
 96. Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein WO, Raab HR, Lordick F, Hartmann JT, Lang H, Frilling A, Stoehlmacher J, Weitz J, Konopke R, Stroszczynski C, Liersch T, Ockert D, Herrmann T, Goekkurt E, Parisi F, Köhne CH. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(1):38-47.
 97. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(5):663-671.
 98. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360(14):1408-1417.
 99. Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein WO, Raab HR, Lordick F, Hartmann JT, Lang H, Frilling A, Stoehlmacher J, Weitz J, Konopke R, Stroszczynski C, Liersch T, Ockert D, Herrmann T, Goekkurt E, Parisi F, Köhne CH. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(1):38-47.
 100. Ye LC, Liu TS, Ren L, Wei Y, Zhu DX, Zai SY, Ye QH, Yu Y, Xu B, Qin XY, Xu J. Randomized controlled trial of cetuximab plus chemotherapy for patients with KRAS wild-type unresectable colorectal liver-limited metastases. *J Clin Oncol.* 2013;31(16):1931-1938.
 101. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocáková I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Oliner KS, Wolf M, Gansert J. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol.* 2010;28(31):4697-4705.
 102. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocáková I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wietzorek J, Sidhu R, Patterson SD. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2013;369(11):1023-1034.
 103. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, Idziaszczyk S, Harris R, Fisher D, Kenny SL, Kay E, Mitchell JK, Madi A, Jasani B, James MD, Bridgewater J, Kennedy MJ, Claes B, Lambrechts D, Kaplan R, Cheadle JP. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet.* 2011;377(9783):2103-2114.

104. Tveit KM, Guren T, Glimelius B, Pfeiffer P, Sorbye H, Pyrhonen S, Sigurdsson F, Kure E, Ik Dahl T, Skovlund E, Fokstuen T, Hansen F, Hofslie E, Birkemeyer E, Johnsson A, Starkhammar H, Yilmaz MK, Keldsen N, Erdal AB, Dajani O, Dahl O, Christoffersen T. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *J Clin Oncol*. 2012;30(15):1755-1762.
105. Primrose J, Falk S, Finch-Jones M, Valle J, O'Reilly D, Siriwardena A, Hornbuckle J, Peterson M, Rees M, Iveson T, Hickish T, Butler R, Stanton L, Dixon E, Little L, Bowers M, Pugh S, Garden OJ, Cunningham D, Maughan T, Bridgewater J. Systemic chemotherapy with or without cetuximab in patients with resectable colorectal liver metastasis: the New EPOC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(6):601-611.
106. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, Griffing S, Bergsland E. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(1):60-65.
107. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figuer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzén F, Cassidy J. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2008;26(12):2013-2019.
108. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB . Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*. 2007;25(12):1539-1544.
109. Masi G, Loupakis F, Salvatore L, Fornaro L, Cremolini C, Cupini S, Ciarlo A, Del Monte F, Cortesi E, Amoroso D, Granetto C, Fontanini G, Sensi E, Lupi C, Andreuccetti M, Falcone A. Bevacizumab with FOLFOXIRI (irinotecan, oxaliplatin, fluorouracil, and folinate) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2010;11(9):845-852.
110. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, Cortesi E, Tomasello G, Ronzoni M, Spadi R, Zaniboni A, Tonini G, Buonadonna A, Amoroso D, Chiara S, Carlomagno C, Boni C, Allegrini G, Boni L, Falcone A. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2014;371(17):1609-1618.
111. Gruenberger B, Tamandl D, Schueller J, Scheithauer W, Zielinski C, Herbst F, Gruenberger T. Bevacizumab, capecitabine, and oxaliplatin as neoadjuvant therapy for patients with potentially curable metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(11):1830-1835.
112. Nasti G, Piccirillo MC, Izzo F, Ottaiano A, Albino V, Delrio P, Romano C, Giordano P, Lastoria S, Caracò C, de Lutio di Castelguidone E, Palaia R, Daniele G, Aloj L, Romano G, Iaffaioli RV. Neoadjuvant FOLFIRI+bevacizumab in patients with resectable liver metastases from colorectal cancer: a phase 2 trial. *Br J Cancer*. 2013;108(8):1566-1570.
113. Andreou A, Aloia TA, Brouquet A, Dickson PV, Zimmitti G, Maru DM, Kopetz S, Loyer EM, Curley SA, Abdalla EK, Vauthey JN. Margin status remains an important determinant of survival after surgical resection of colorectal liver metastases in the era of modern chemotherapy. *Ann Surg*. 2013;257(6):1079-1088.

114. Masi G, Cupini S, Marcucci L, Cerri E, Loupakis F, Allegrini G, Brunetti IM, Pfanner E, Viti M, Goletti O, Filipponi F, Falcone A. Treatment with 5-fluorouracil/folinic acid, oxaliplatin, and irinotecan enables surgical resection of metastases in patients with initially unresectable metastatic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2006;13(1):58-65.
115. Pozzo C, Basso M, Cassano A, Quirino M, Schinzari G, Trigila N, Vellone M, Giuliani F, Nuzzo G, Barone C. Neoadjuvant treatment of unresectable liver disease with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid in colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2004;15(6):933-939.
116. Bertolini F, Malavasi N, Scarabelli L, , Fiocchi F, Bagni B, Del Giovane C, Colucci G, Gerunda GE, Depenni R, Zironi S, Fontana A, Pettorelli E, Luppi G, Conte PF. FOLFOX6 and bevacizumab in non-optimally resectable liver metastases from colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2011;104(7):1079-1084.
117. Uetake H, Yasuno M, Ishiguro M, Kameoka S, Shimada Y, Takahashi K, Watanabe T, Muro K, Baba H, Yamamoto J, Mizunuma N, Tamagawa H, Mochizuki I, Kinugasa Y, Kikuchi T, Sugihara K. A multicenter phase II trial of mFOLFOX6 plus bevacizumab to treat liver-only metastases of colorectal cancer that are unsuitable for upfront resection (TRICC0808). *Ann Surg Oncol*. 2015;22(3):908-915.
118. Wong R, Cunningham D, Barbachano Y, Saffery C, Valle J, Hickish T, Mudan S, Brown G, Khan A, Wotherspoon A, Strimpakos AS, Thomas J, Compton S, Chua YJ, Chau I. A multicentre study of capecitabine, oxaliplatin plus bevacizumab as perioperative treatment of patients with poor-risk colorectal liver-only metastases not selected for upfront resection. *Ann Oncol*. 2011;22(9):2042-2048.
119. Bennouna J, Borg C, Delord JP, Hussein F, Trillet-Lenoir V, Faroux R, François E, Ychou M, Goldwasser F, Bouché O, Senellart H, Kraemer S, Douillard JY. Bevacizumab combined with chemotherapy in the second-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the phase II BEVACOLOR study. *Clin Colorectal Cancer*. 2012;11(1):38-44.
120. Volk AM, Fritzmann J, Reissfelder C, Weber GF, Weitz J, Rahbari NN. Impact of Bevacizumab on parenchymal damage and functional recovery of the liver in patients with colorectal liver metastases. *BMC Cancer*. 2015;16(1):84.
121. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(3):205-216.
122. Rubbia-Brandt L, Giostra E, Brezault C, , Roth AD, Andres A, Audard V, Sartoretti P, Dousset B, Majno PE, Soubrane O, Chaussade S, Mentha G, Terris B. Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neoadjuvant chemotherapy followed by liver surgery. *Ann Oncol*. 2007;18(2):299-304.
123. Adam R, Pascal G, Castaing D, Azoulay D, Delvart V, Paule B, Levi F, Bismuth H. Tumor progression while on chemotherapy: a contraindication to liver resection for multiple colorectal metastases? *Ann Surg*. 2004;240(6):1052-1061; discussion 1061-1054.
124. Ribero D, Wang H, Donadon M, Zorzi D, Thomas MB, Eng C, Chang DZ, Curley SA, Abdalla EK, Ellis LM, Vauthey JN. Bevacizumab improves

- pathologic response and protects against hepatic injury in patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal liver metastases. *Cancer*. 2007;110(12):2761-2767.
125. Blazer DG, Kishi Y, Maru DM, Kopetz S, Chun YS, Overman MJ, Fogelman D, Eng C, Chang DZ, Wang H, Zorzi D, Ribero D, Ellis LM, Glover KY, Wolff RA, Curley SA, Abdalla EK, Vauthey JN. Pathologic response to preoperative chemotherapy: a new outcome end point after resection of hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol*. 2008;26(33):5344-5351.
 126. Chun YS, Vauthey JN, Boonsirikamchai P, Maru DM, Kopetz S, Palavecino M, Curley SA, Abdalla EK, Kaur H, Charnsangavej C, Loyer EM. Association of computed tomography morphologic criteria with pathologic response and survival in patients treated with bevacizumab for colorectal liver metastases. *JAMA*. 2009;302(21):2338-2344.
 127. Chun YS, Laurent A, Maru D, Vauthey JN. Management of chemotherapy-associated hepatotoxicity in colorectal liver metastases. *Lancet Oncol*. 2009;10(3):278-286.
 128. Zorzi D, Laurent A, Pawlik TM, Lauwers GY, Vauthey JN, Abdalla EK. Chemotherapy-associated hepatotoxicity and surgery for colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2007;94(3):274-286.
 129. Peppercorn PD, Reznick RH, Wilson P, Slevin ML, Gupta RK. Demonstration of hepatic steatosis by computerized tomography in patients receiving 5-fluorouracil-based therapy for advanced colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1998;77(11):2008-2011.
 130. Sørensen P, Edal AL, Madsen EL, Fenger C, Poulsen MR, Petersen OF. Reversible hepatic steatosis in patients treated with interferon alfa-2a and 5-fluorouracil. *Cancer*. 1995;75(10):2592-2596.
 131. Kooby DA, Fong Y, Suriawinata A, Gonen M, Allen PJ, Klimstra DS, DeMatteo RP, D'Angelica M, Blumgart LH, Jarnagin WR. Impact of steatosis on perioperative outcome following hepatic resection. *J Gastrointest Surg*. 2003;7(8):1034-1044.
 132. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, Bugat R, Findlay M, Frings S, Jahn M, McKendrick J, Osterwalder B, Perez-Manga G, Rosso R, Rougier P, Schmiegel WH, Seitz JF, Thompson P, Vieitez JM, Weitzel C, Harper P. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J Clin Oncol*. 2001;19(21):4097-4106.
 133. Vauthey JN, Pawlik TM, Ribero D, Wu TT, Zorzi D, Hoff PM, Xiong HQ, Eng C, Lauwers GY, Mino-Kenudson M, Risio M, Muratore A, Capussotti L, Curley SA, Abdalla EK. Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol*. 2006;24(13):2065-2072.
 134. Pawlik TM, Olino K, Gleisner AL, Torbenson M, Schulick R, Choti MA. Preoperative chemotherapy for colorectal liver metastases: impact on hepatic histology and postoperative outcome. *J Gastrointest Surg*. 2007;11(7):860-868.
 135. Singh S, Allen AM, Wang Z, Prokop LJ, Murad MH, Loomba R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015;13(4):643-654.e641-649; quiz e639-640.

136. Robinson SM, Wilson CH, Burt AD, Manas DM, White SA. Chemotherapy-associated liver injury in patients with colorectal liver metastases: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(13):4287-4299.
137. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002;346(16):1221-1231.
138. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004;114(2):147-152.
139. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-845.
140. Khan AZ, Morris-Stiff G, Makuuchi M. Patterns of chemotherapy-induced hepatic injury and their implications for patients undergoing liver resection for colorectal liver metastases. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2009;16(2):137-144.
141. Fernandez FG, Ritter J, Goodwin JW, Linehan DC, Hawkins WG, Strasberg SM. Effect of steatohepatitis associated with irinotecan or oxaliplatin pretreatment on resectability of hepatic colorectal metastases. *J Am Coll Surg*. 2005;200(6):845-853.
142. Karoui M, Penna C, Amin-Hashem M, Mitry E, Benoist S, Franc B, Rougier P, Nordlinger B. Influence of preoperative chemotherapy on the risk of major hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg*. 2006;243(1):1-7.
143. Rubbia-Brandt L, Audard V, Sartoretti P, Roth AD, Brezault C, Le Charpentier M, Dousset B, Morel P, Soubrane O, Chaussade S, Mentha G, Terris B. Severe hepatic sinusoidal obstruction associated with oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2004;15(3):460-466.
144. Rubbia-Brandt L, Lauwers GY, Wang H, Majno PE, Tanabe K, Zhu AX, Brezault C, Soubrane O, Abdalla EK, Vauthey JN, Mentha G, Terris B. Sinusoidal obstruction syndrome and nodular regenerative hyperplasia are frequent oxaliplatin-associated liver lesions and partially prevented by bevacizumab in patients with hepatic colorectal metastasis. *Histopathology*. 2010;56(4):430-439.
145. Bearman SI. The syndrome of hepatic veno-occlusive disease after marrow transplantation. *Blood*. 1995;85(11):3005-3020.
146. Willmot F, Robertson G. Originally published as Volume 2, Issue 5069. Senecio disease, or cirrhosis of the liver due to senecio poisoning. *The Lancet*. 1920;196(5069):848-849.
147. Jacobs P, Miller JL, Uys CJ, Dietrich BE. Fatal veno-occlusive disease of the liver after chemotherapy, whole-body irradiation and bone marrow transplantation for refractory acute leukaemia. *S Afr Med J*. 1979;55(1):5-10.
148. Berk PD, Popper H, Krueger GR, Decker J, Herzig G, Graw RG. Veno-occlusive disease of the liver after allogeneic bone marrow transplantation: possible association with graft-versus-host disease. *Ann Intern Med*. 1979;90(2):158-164.
149. McDonald GB, Sharma P, Matthews DE, Shulman HM, Thomas ED. Venocclusive disease of the liver after bone marrow transplantation: diagnosis, incidence, and predisposing factors. *Hepatology*. 1984;4(1):116-122.
150. Dalle JH, Giralt SA. Hepatic Veno-Occlusive Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Risk Factors and Stratification, Prophylaxis, and Treatment. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(3):400-409.
151. Coppel JA, Richardson PG, Soiffer R, Martin PL, Kernan NA, Chen A, Guinan E, Vogelsang G, Krishnan A, Giralt S, Revta C, Carreau NA, Iacobelli M,

- Carreras E, Ruutu T, Barbui T, Antin JH, Niederwieser D. Hepatic veno-occlusive disease following stem cell transplantation: incidence, clinical course, and outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(2):157-168.
152. Shulman HM, McDonald GB, Matthews D, Doney KC, Kopecky KJ, Gauvreau JM, Thomas ED. An analysis of hepatic venoocclusive disease and centrilobular hepatic degeneration following bone marrow transplantation. *Gastroenterology*. 1980;79(6):1178-1191.
153. Aloia T, Sebagh M, Plasse M, Karam V, Lévi F, Giacchetti S, Azoulay D, Bismuth H, Castaing D, Adam R. Liver histology and surgical outcomes after preoperative chemotherapy with fluorouracil plus oxaliplatin in colorectal cancer liver metastases. *J Clin Oncol*. 2006;24(31):4983-4990.
154. Julie C LM, Aust D. Pathological analysis of hepatic injury after oxaliplatin-based neoadjuvant chemotherapy of colorectal cancer liver metastases: results of the EORTC Intergroup phase III study 40983. *ASCO 2007 Gastrointestinal Cancers Symposium*; Jan 19–21, 2007; Orlando, FL, USA.
155. Aloia T, Sebagh M, Plasse M, Karam V, Lévi F, Giacchetti S, Azoulay D, Bismuth H, Castaing D, Adam R. Liver histology and surgical outcomes after preoperative chemotherapy with fluorouracil plus oxaliplatin in colorectal cancer liver metastases. *J Clin Oncol*. 2006;24(31):4983-4990.
156. Nakano H, Oussoultzoglou E, Rosso E, Casnedi S, Chenard-Neu MP, Dufour P, Bachellier P, Jaeck D. Sinusoidal injury increases morbidity after major hepatectomy in patients with colorectal liver metastases receiving preoperative chemotherapy. *Ann Surg*. 2008;247(1):118-124.
157. Kishi Y, Zorzi D, Contreras CM, Maru DM, Kopetz S, Ribero D, Motta M, Ravarino N, Risio M, Curley SA, Abdalla EK, Capussotti L, Vauthey JN. Extended preoperative chemotherapy does not improve pathologic response and increases postoperative liver insufficiency after hepatic resection for colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(11):2870-2876.
158. Welsh FK, Tilney HS, Tekkis PP, John TG, Rees M. Safe liver resection following chemotherapy for colorectal metastases is a matter of timing. *Br J Cancer*. 2007;96(7):1037-1042.
159. Brouquet A, Benoist S, Julie C, Penna C, Beauchet A, Rougier P, Nordlinger B. Risk factors for chemotherapy-associated liver injuries: A multivariate analysis of a group of 146 patients with colorectal metastases. *Surgery*. 2009;145(4):362-371.
160. Zhao J, van Mierlo KMC, Gómez-Ramírez J, Kim H, Pilgrim CHC, Pessaux P, Rensen SS, van der Stok EP, Schaap FG, Soubrane O, Takamoto T, Viganò L, Winkens B, Dejong CHC, Olde Damink SWM. Systematic review of the influence of chemotherapy-associated liver injury on outcome after partial hepatectomy for colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2017;104(8):990-1002.
161. D'Angelica M, Kornprat P, Gonen M, Chung KY, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Fong Y, Kemeny N, Blumgart LH, Saltz LB. Lack of evidence for increased operative morbidity after hepatectomy with perioperative use of bevacizumab: a matched case-control study. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(2):759-765.
162. Reddy SK, Morse MA, Hurwitz HI, Bendell JC, Gan TJ, Hill SE, Clary BM. Addition of bevacizumab to irinotecan- and oxaliplatin-based preoperative chemotherapy regimens does not increase morbidity after resection of colorectal liver metastases. *J Am Coll Surg*. 2008;206(1):96-106.
163. Millet G, Truant S, Leteurtre E, Hebbar M, Zerbib P, Huet G, Boleslawski E, Pruvot FR. Volumetric analysis of remnant liver regeneration after major

- hepatectomy in bevacizumab-treated patients: a case-matched study in 82 patients. *Ann Surg.* 2012;256(5):755-761; discussion 761-752.
164. Zorzi D, Chun YS, Madoff DC, Abdalla EK, Vauthey JN. Chemotherapy with bevacizumab does not affect liver regeneration after portal vein embolization in the treatment of colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(10):2765-2772.
 165. Constantinidou A, Cunningham D, Shurmahy F, Asghar U, Barbachano Y, Khan A, Mudan S, Rao S, Chau I. Perioperative chemotherapy with or without bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer undergoing liver resection. *Clin Colorectal Cancer.* 2013;12(1):15-22.
 166. Dede K, Mersich T, Besznyák I, Zaránd A, Salamon F, Baranyai ZS, Landherr L, Jakab F, Bursics A. Bevacizumab treatment before resection of colorectal liver metastases: safety, recovery of liver function, pathologic assessment. *Pathol Oncol Res.* 2013;19(3):501-508.
 167. Selzer G, Parker RG. Senecio poisoning exhibiting as Chiari's syndrome; a report on twelve cases. *Am J Pathol.* 1951;27(5):885-907.
 168. Bras G, Jelliffe DB, Stuart KL. Veno-occlusive disease of liver with nonportal type of cirrhosis, occurring in Jamaica. *AMA Arch Pathol.* 1954;57(4):285-300.
 169. Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW. Pyrrolizidine alkaloids--genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metab Rev.* 2004;36(1):1-55.
 170. Cushny A. On the action of senecio alkaloids and the causation of the hepatic cirrhosis of cattle (Pictou, Molteno, or Winton disease). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* June 1911;2(6):531-548.
 171. Shulman HM, Gown AM, Nugent DJ. Hepatic veno-occlusive disease after bone marrow transplantation. Immunohistochemical identification of the material within occluded central venules. *Am J Pathol.* 1987;127(3):549-558.
 172. Schoental R, Magee PN. Further observations on the subacute and chronic liver changes in rats after a single dose of various pyrrolizidine (Senecio) alkaloids. *J Pathol Bacteriol.* 1959;78:471-482.
 173. Allen JR, Carstens LA, Katagiri GJ. Hepatic veins of monkeys with veno-occlusive disease. Sequential ultrastructural changes. *Arch Pathol.* 1969;87(3):279-289.
 174. Teicher BA, Crawford JM, Holden SA. Glutathione monoethyl ester can selectively protect liver from high dose BCNU or cyclophosphamide. *Cancer.* 1988;62(7):1275-1281.
 175. Deleve LD. Dacarbazine toxicity in murine liver cells: a model of hepatic endothelial injury and glutathione defense. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;268(3):1261-1270.
 176. DeLeve LD. Cellular target of cyclophosphamide toxicity in the murine liver: role of glutathione and site of metabolic activation. *Hepatology.* 1996;24(4):830-837.
 177. DeLeve LD, McCuskey RS, Wang X, Hu L, McCuskey MK, Epstein RB, Kanel GC. Characterization of a reproducible rat model of hepatic veno-occlusive disease. *Hepatology.* 1999;29(6):1779-1791.
 178. DeLeve LD, Ito Y, Bethea NW, McCuskey MK, Wang X, McCuskey RS. Embolization by sinusoidal lining cells obstructs the microcirculation in rat sinusoidal obstruction syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(6):G1045-1052.
 179. DeLeve LD, Wang X, Kanel GC, Ito Y, Bethea NW, McCuskey MK, Tokes ZA, Tsai J, McCuskey RS. Decreased hepatic nitric oxide production contributes to

- the development of rat sinusoidal obstruction syndrome. *Hepatology*. 2003;38(4):900-908.
180. DeLeve LD, Shulman HM, McDonald GB. Toxic injury to hepatic sinusoids: sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease). *Semin Liver Dis*. 2002;22(1):27-42.
 181. Fan CQ, Crawford JM. Sinusoidal obstruction syndrome (hepatic veno-occlusive disease). *J Clin Exp Hepatol*. 2014;4(4):332-346.
 182. DeLeve LD, Wang X, Kuhlenkamp JF, Kaplowitz N. Toxicity of azathioprine and monocrotaline in murine sinusoidal endothelial cells and hepatocytes: the role of glutathione and relevance to hepatic venoocclusive disease. *Hepatology*. 1996;23(3):589-599.
 183. Deleve LD, Wang X, Tsai J, Kanel G, Strasberg S, Tokes ZA. Sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease) in the rat is prevented by matrix metalloproteinase inhibition. *Gastroenterology*. 2003;125(3):882-890.
 184. Robinson SM, Mann J, Vasilaki A, Mathers J, Burt AD, Oakley F, White SA, Mann DA. Pathogenesis of FOLFOX induced sinusoidal obstruction syndrome in a murine chemotherapy model. *J Hepatol*. 2013;59(2):318-326.
 185. McWhirter D, Kitteringham N, Jones RP, Malik H, Park K, Palmer D. Chemotherapy induced hepatotoxicity in metastatic colorectal cancer: a review of mechanisms and outcomes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(2):404-415.
 186. Fernandez M, Mejias M, Garcia-Pras E, Mendez R, Garcia-Pagan JC, Bosch J. Reversal of portal hypertension and hyperdynamic splanchnic circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology*. 2007;46(4):1208-1217.
 187. Smith LH, Dixon JD, Stringham JR, Eren M, Elokda H, Crandall DL, Washington K, Vaughan DE. Pivotal role of PAI-1 in a murine model of hepatic vein thrombosis. *Blood*. 2006;107(1):132-134.
 188. Iguchi A, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi K, Matsuo K, Kitajima I, Maruyama I. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the cytokines causative and predictive of hepatic veno-occlusive disease (VOD) in stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27(11):1173-1180.
 189. You SH, Park BJ, Kim YH. Hepatic Lesions that Mimic Metastasis on Radiological Imaging during Chemotherapy for Gastrointestinal Malignancy: Recent Updates. *Korean J Radiol*. 2017;18(3):413-426.
 190. Nakamura K, Hatano E, Narita M, Miyagawa-Hayashino A, Koyama Y, Nagata H, Iwaisako K, Taura K, Uemoto S. Sorafenib attenuates monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome in rats through suppression of JNK and MMP-9. *J Hepatol*. 2012;57(5):1037-1043.
 191. Schiffer E, Frossard JL, Rubbia-Brandt L, Mentha G, Pastor CM. Hepatic regeneration is decreased in a rat model of sinusoidal obstruction syndrome. *J Surg Oncol*. 2009;99(7):439-446.
 192. Reddy SK, Zorzi D, Lum YW, Barbas AS, Pawlik TM, Ribero D, Abdalla EK, Choti MA, Kemp C, Vauthey JN, Morse MA, White RR, Clary BM. Timing of multimodality therapy for resectable synchronous colorectal liver metastases: a retrospective multi-institutional analysis. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(7):1809-1819.
 193. Soubrane O, Brouquet A, Zalinski S, Terris B, Brézault C, Mallet V, Goldwasser F, Scatton O. Predicting high grade lesions of sinusoidal obstruction syndrome related to oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal liver metastases: correlation with post-hepatectomy outcome. *Ann Surg*. 2010;251(3):454-460.

194. Hubert C, Dahrenmoller C, Marique L, Jabbour N, Gianello P, Leclercq I. Hepatic regeneration in a rat model is impaired by chemotherapy agents used in metastatic colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(11):1471-1478.
195. Keizman D, Maimon N, Ish-Shalom M, Buchbut D, Inbar M, Klein B, Bernheim J, Goldiner I, Leikin-Frenkel A, Konikoff F. An animal model for chemotherapy-associated steatohepatitis and its prevention by the oral administration of fatty acid bile acid conjugate. *Cancer*. 2010;116(1):251-255.
196. Rickenbacher A, DeOliveira ML, Tian Y, Jang JH, Riener MO, Graf R, Moritz W, Clavien PA. Arguments against toxic effects of chemotherapy on liver injury and regeneration in an experimental model of partial hepatectomy. *Liver Int*. 2011;31(3):313-321.
197. Higgins G, Anderson, RM. Experimental pathology of liver. I. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*. 1931;12:186 – 202.
198. Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg*. 2003;16(2):99-102.
199. Mitchell C, Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc*. 2008;3(7):1167-1170.
200. Jafari A, Wehner S, Kalff JC, Manekeller S. Sinusoidal obstruction syndrome in the animal model: influence on liver surgery. *Langenbecks Arch Surg*. 2016.
201. MacCallum DE, Hall PA. The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J Pathol*. 2000;191(3):286-298.
202. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
203. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Férard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jørgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(7):718-724.
204. Multicenter study of Tina-quant Albumin in urine and β -N-acetylglucosaminidase (β -NAG) in urine. Workshop Munich, November 29-30,. *Wien klin Wschr*. 1990.
205. Malloy, HT EK. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem*. 1937(119):481-490.
206. AW W. Modification of the Malloy-Evelyn method for a simple, reliable determination of total bilirubin in serun. *Scand J Clin Lab Invest*. 1972;29.
207. Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*. 2006;38(4):317-323.
208. Schuldes S. Veränderungen der Konzentration von Chemokinen in peritonealer Flüssigkeit und Serum bei Patienten mit Leberzirrhose und Peritonitis. Regensburg: Lehrstuhl für Innere Medizin I, Direktorin: Prof. Dr. med. M. Müller-Schilling, Fakultät für Medizin der Universität Regensburg; 2015.
209. Baker HN, Murphy R, Lopez E, Garcia C. Conversion of a capture ELISA to a Luminex xMAP assay using a multiplex antibody screening method. *J Vis Exp*. 2012(65).

210. Zhang Y, Birru R, Di YP. Analysis of clinical and biological samples using microsphere-based multiplexing Luminex system. *Methods Mol Biol.* 2014;1105:43-57.
211. Yin S, Wang H, Park O, Wei W, Shen J, Gao B. Enhanced liver regeneration in IL-10-deficient mice after partial hepatectomy via stimulating inflammatory response and activating hepatocyte STAT3. *Am J Pathol.* 2011;178(4):1614-1621.
212. Kumar A, Palek R, Liska V. A Critical Analysis of Experimental Animal Models of Sinusoidal Obstruction Syndrome. *J Clin Exp Hepatol.* 2019;9(3):345-353.
213. Stevens WC, Eger EI, White A, Halsey MJ, Munger W, Gibbons RD, Dolan W, Shargel R. Comparative toxicities of halothane, isoflurane, and diethyl ether at subanesthetic concentrations in laboratory animals. *Anesthesiology.* 1975;42(4):408-419.
214. Overmyer KA, Thonusin C, Qi NR, Burant CF, Evans CR. Impact of anesthesia and euthanasia on metabolomics of mammalian tissues: studies in a C57BL/6J mouse model. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117232.
215. McCarty MF, Barroso-Aranda J, Contreras F. Genistein and phycocyanobilin may prevent hepatic fibrosis by suppressing proliferation and activation of hepatic stellate cells. *Med Hypotheses.* 2009;72(3):330-332.
216. Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gómez-Pérez FJ, Hernández-Pando R, Tovar AR. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J Nutr.* 2004;134(3):522-529.
217. Bucher NL. Regeneration of Mammalian Liver. *Int Rev Cytol.* 1963;15:245-300.
218. Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science.* 2007;317(5834):121-124.
219. Desbois-Mouthon C, Wendum D, Cadoret A, Rey C, Leneuve P, Blaise A, Housset C, Tronche F, Le Bouc Y, Holzenberger M. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R knockout. *FASEB J.* 2006;20(6):773-775.
220. Iakova P, Awad SS, Timchenko NA. Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell.* 2003;113(4):495-506.
221. Roth RA, Reindel JF. Lung vascular injury from monocrotaline pyrrole, a putative hepatic metabolite. *Adv Exp Med Biol.* 1991;283:477-487.
222. Schultze AE, Roth RA. Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 1998;1(4):271-346.
223. Jafari A, Matthaehi H, Wehner S, Tonguc T, Kalff JC, Manekeller S. Bevacizumab exacerbates sinusoidal obstruction syndrome (SOS) in the animal model and increases MMP 9 production. *Oncotarget.* 2018;9(31):21797-21810.
224. Agostini J, Benoist S, Seman M, Julié C, Imbeaud S, Letourneur F, Cagnard N, Rougier P, Brouquet A, Zucman-Rossi J, Laurent-Puig P. Identification of molecular pathways involved in oxaliplatin-associated sinusoidal dilatation. *J Hepatol.* 2012;56(4):869-876.
225. Imai K, Emi Y, Iyama KI, Beppu T, Ogata Y, Kakeji Y, Samura H, Oki E, Akagi Y, Maehara Y, Baba H. Splenic volume may be a useful indicator of the protective effect of bevacizumab against oxaliplatin-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome. *Eur J Surg Oncol.* 2014;40(5):559-566.

226. Arakawa Y, Shimada M, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Hanaoka J, Kanamoto M, Iwahashi S, Saito Y, Yamada S, Asanoma M, Takasu C, Bando Y. Bevacizumab improves splenomegaly and decreases production of hyaluronic acid after L-OHP based chemotherapy. *Anticancer Res.* 2014;34(4):1953-1958.
227. Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Levi BZ. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res.* 1994;5(1):89-97.
228. Rubbia-Brandt L, Tauzin S, Brezault C, Delucinge-Vivier C, Descombes P, Dousset B, Majno PE, Mentha G, Terris B. Gene expression profiling provides insights into pathways of oxaliplatin-related sinusoidal obstruction syndrome in humans. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(4):687-696.
229. Alaseem A, Alhazzani K, Dondapati P, Alobid S, Bishayee A, Rathinavelu A. Matrix Metalloproteinases: A challenging paradigm of cancer management. *Semin Cancer Biol.* 2019;56:100-115.
230. Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z, Mittal V, Kobayashi H, Shido K, Lyden D, Sato TN, Rabbany SY, Rafii S. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature.* 2010;468(7321):310-315.
231. Golse N, Bucur PO, Adam R, Castaing D, Sa Cunha A, Vibert E. New paradigms in post-hepatectomy liver failure. *J Gastrointest Surg.* 2013;17(3):593-605.
232. Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, Lauth WW. Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide.* 2001;5(5):453-464.
233. Remberger M, Ringdén O. Serum levels of cytokines after bone marrow transplantation: increased IL-8 levels during severe veno-occlusive disease of the liver. *Eur J Haematol.* 1997;59(4):254-262.
234. Neumann K, Rudolph C, Neumann C, Janke M, Amsen D, Scheffold A. Liver sinusoidal endothelial cells induce immunosuppressive IL-10-producing Th1 cells via the Notch pathway. *Eur J Immunol.* 2015;45(7):2008-2016.
235. Drucker C, Gewiese J, Malchow S, Scheller J, Rose-John S. Impact of interleukin-6 classic- and trans-signaling on liver damage and regeneration. *J Autoimmun.* 2010;34(1):29-37.
236. Salat C, Holler E, Kolb HJ, Reinhardt B, Pihusch R, Wilmanns W, Hiller E. Plasminogen activator inhibitor-1 confirms the diagnosis of hepatic veno-occlusive disease in patients with hyperbilirubinemia after bone marrow transplantation. *Blood.* 1997;89(6):2184-2188.
237. Richardson PG, Carreras E, Iacobelli M, Nejadnik B. The use of defibrotide in blood and marrow transplantation. *Blood Adv.* 2018;2(12):1495-1509.
238. Benimetskaya L, Wu S, Voskresenskiy AM, Echart C, Zhou JF, Shin J, Iacobelli M, Richardson P, Ayyanar K, Stein CA. Angiogenesis alteration by defibrotide: implications for its mechanism of action in severe hepatic veno-occlusive disease. *Blood.* 2008;112(10):4343-4352.
239. Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol.* 2006;8(8):877-884.
240. Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Däbritz JHM, Zhao Z, Yu Y, Dörr JR, Dimitrova L, Lenze D, Monteiro Barbosa IA, Mendoza-Parra MA, Kanashova T, Metzner M, Pardon K, Reimann M, Trumpp A, Dörken B, Zuber J, Gronemeyer H, Hummel M, Dittmar G, Lee S, Schmitt CA. Senescence-

- associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*. 2018;553(7686):96-100.
241. Sakai M, Strasser SI, Shulman HM, McDonald SJ, Schoch HG, McDonald GB. Severe hepatocellular injury after hematopoietic cell transplant: incidence, etiology and outcome. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44(7):441-447.
242. Soubrane O, Brouquet A, Zalinski S, Terris B, Brézault C, Mallet V, Goldwasser F, Scatton O. Predicting high grade lesions of sinusoidal obstruction syndrome related to oxaliplatin-based chemotherapy for colorectal liver metastases: correlation with post-hepatectomy outcome. *Ann Surg*. 2010;251(3):454-460.
243. Ellis LM, Hicklin DJ. Resistance to Targeted Therapies: Refining Anticancer Therapy in the Era of Molecular Oncology. *Clin Cancer Res*. 2009;15(24):7471-7478.
244. Ebos JM, Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(4):210-221.
245. Vasudev NS, Reynolds AR. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*. 2014;17(3):471-494.
246. Frentzas S, Simoneau E, Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, Kostaras E, Nathan M, Wotherspoon A, Gao ZH, Shi Y, Van den Eynden G, Daley F, Peckitt C, Tan X, Salman A, Lazaris A, Gazinska P, Berg TJ, Eltahir Z, Ritsma L, Van Rheenen J, Khashper A, Brown G, Nystrom H, Sund M, Van Laere S, Loyer E, Dirix L, Cunningham D, Metrakos P, Reynolds AR. Vessel co-option mediates resistance to anti-angiogenic therapy in liver metastases. *Nat Med*. 2016;22(11):1294-1302.
247. Bose D, Meric-Bernstam F, Hofstetter W, Reardon DA, Flaherty KT, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor targeted therapy in the perioperative setting: implications for patient care. *Lancet Oncol*. 2010;11(4):373-382.

7. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Gregor Duwe, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Etablierung eines Tiermodells zur Untersuchung des Sinusoidalen Obstruktionssyndroms in der Leber von Mäusen, behandelt mit Oxaliplatin, einem VEGF-Inhibitor und anschließender Leberteilektomie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten.

Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8. Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

9. Publikationsliste

Journal Publikationen

1. Andreou A, Pesthy S, Struecker B, Dadras M, Raakow J, Knitter S, Duwe G, Sauer IM, Denecke C, Chopra S, Pratschke J, Biebl M. Incidence and Risk Factors of Symptomatic Hiatal Hernia Following Resection for Gastric and Esophageal Cancer. *Anticancer Research*, 2017 Dec;37(12):7031-7036
2. Duwe G, Knitter S, Pesthy S, Beierle AS, Bahra M, Schmelzle M, Schmuck RB, Lohneis P, Raschzok N, Öllinger R, Sinn M, Struecker B, Sauer IM, Pratschke J, Andreou A. Hepatotoxicity following systematic therapy for colorectal liver metastases and the impact of chemotherapy-associated liver injury on outcomes after curative liver resection. *Eur J Surg Oncol*, 2017 Sep;43(9):1668-1681
3. Savic LJ, Chapiro J, Duwe G & Geschwind JF. Targeting glucose metabolism in cancer: a new class of agents for loco-regional and systemic therapy of liver cancer and beyond? *Hepatic Oncology*, 2016, Vol. 3, No. 1, Pages 19-28

Poster (Abstracts) Publikationen

1. Knitter S, Duwe G, Beierle AS, Pesthy S, Führer K, Lippert S, Tang P, Reutzel-Selke A, Lohneis P, Schmuck RB, Schmelzle M, Sauer IM, Bahra M, Pratschke J, Andreou A. Inhibition of vascular endothelial growth factor protects against the development of oxaliplatin-induced sinusoidal obstruction syndrome in a murine model; Abstract ID: 95, 136. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 2019, München, Deutschland. *Innov. Surg Sci.*, 2019 Mar; 4 (Suppl 1): s1-s205
2. Beierle AS, Knitter S, Pesthy S, Duwe G, Schmuck RB, Sauer IM, Schmelzle M, Bahra M, Pratschke J, Andreou A. Sinusoidal endothelial cells and vascular endothelial growth factor are key players in an in-vitro model of oxaliplatin-induced sinusoidal obstructions syndrome. Electronic Posters (EP01A-E01E) – Liver, 13th IHPBA World Congress, Geneva, Schweiz. *HPB*, 2018, 20 (S2), S333-S5

10. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Johann Pratschke, Direktor der Chirurgischen Klinik der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte und Campus Virchow-Klinikum, in dessen Abteilung die Arbeiten stattfinden konnten.

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Igor Maximilian Sauer habe ich für die hervorragende Leitung, sowie die Bereitstellung der Labore der Experimentellen Chirurgie der Chirurgischen Klinik zu danken, in der die Arbeiten durchgeführt wurden. Seine fachliche Expertise und Schaffung des professionellen Umfeldes waren unabdingbar für die Durchführung der Forschungsprojekte.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Marcus Bahra bedanken, unter dessen wissenschaftliche Leitung ich das Projektvorhaben durchführen konnte. Während der vergangenen Jahre konnte ich durch seine vertrauensvolle wissenschaftliche und klinische Betreuung mein Interesse in der onkologischen Chirurgie stetig weiterdenken und ausbauen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. med. Andreas Andreou für die Vorlage des Themas bedanken und das mir in diesem Zusammenhang entgegengebrachte Vertrauen. Die vorliegende Dissertation wäre ohne seine kontinuierliche, intensive und vertrauensvolle Betreuung nicht möglich gewesen.

In besonderem Maße habe ich Herrn Professor Dr. Jean-Nicolas Vauthey, Direktor der Hepato-Pankreato-Biliären Chirurgie an der University of Texas MD Anderson Cancer Center (USA), meinen Dank zu entrichten. Bei ihm habe ich die einmalige Möglichkeit erhalten meine wissenschaftliche und medizinische Ausbildung im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes in seiner Arbeitsgruppe zu erweitern. Seine ausgezeichnete Betreuung haben meinen beruflichen Werdegang maßgeblich geprägt und bereichert.

Herrn Privatdozent Dr. med. Philipp Lohneis danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut und seinem großen Engagement.

Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders für die hervorragende wissenschaftlich-methodische Anleitung, Betreuung und Unterstützung von Frau Dr. rer. medic Anja Reutzel-Selke, Frau Dipl. Ing. Kirsten Führer, Frau Anja Schirmeier, Herrn Dipl. Ing. Dietrich Polenz, Herrn Steffen Lippert und Herrn Peter Tang bedanken. Ohne deren Expertise und Erfahrung wäre das Forschungsvorhaben nicht möglich gewesen.

Ferner gilt mein Dank Herrn Sebastian Knitter für die stets professionelle und vertrauensvolle Zusammenarbeit als medizinische Doktoranden während der gemeinsamen Forschungsarbeiten. Ebenso bedanke ich mich bei Anika Beierle und Sina Pesthy für die im weiteren Verlauf entstandene Zusammenarbeit und Unterstützung.

Der Monika Kutzner Stiftung sowie der Brigitte und Dr. Konstanze Wegener-Stiftung danke ich für die finanzielle Förderung des Forschungsvorhabens.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei der Friedrich-Naumann-Stiftung für die Freiheit für die besondere und prägende Unterstützung als Stipendiat während meiner Studienzeit bedanken.

Mein größter Dank gilt schließlich meiner Familie und insbesondere meinen Eltern. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.