

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Ex vivo Ergebnisse

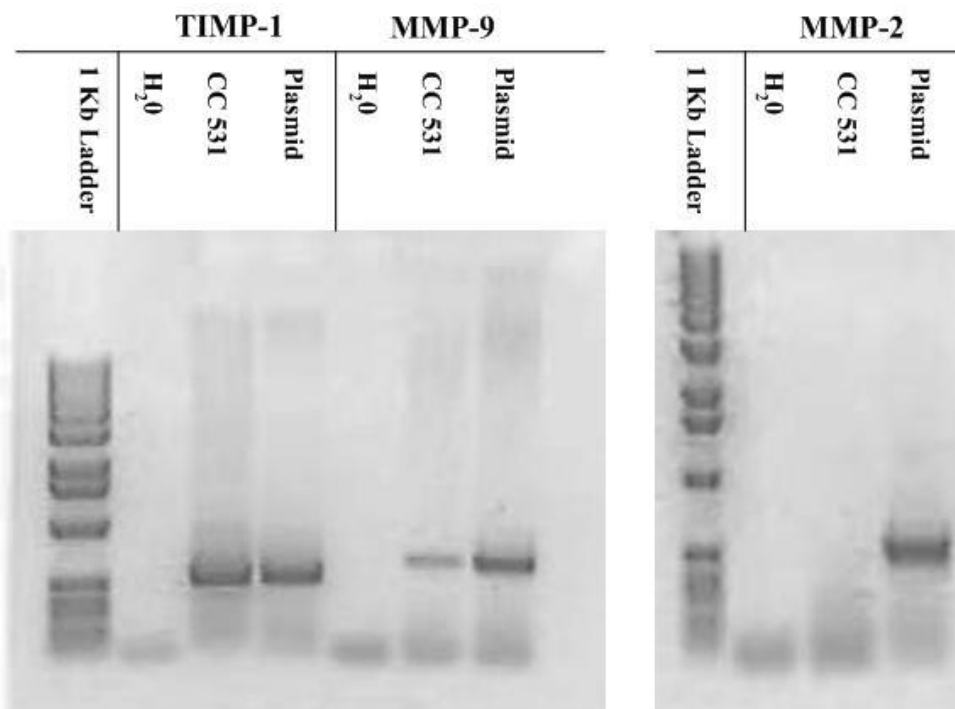
#### 5.1.1 RT-PCR (reverse transcription – polymerase chain reaction)

Zur Überprüfung des Expressionsprofils von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren natürlichen Inhibitoren (TIMPs = tissue inhibitors of metalloproteinases) bei den CC 531-Tumorzellen wurde eine RT-PCR durchgeführt. Zuerst wurde RNA aus den Tumorzellen isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und anschliessend eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Gelelektrophorese.

Das Ergebnis zeigt, dass die Rattentumorzelllinie CC 531 MMP-9 und TIMP-1 exprimiert, jedoch nicht MMP-2.

	TIMP-1	MMP-9	MMP-2
CC531-Zellen	+	+	-

**Tabelle 4:** Diese Tabelle zeigt das Expressionsprofil von TIMP-1, MMP-9 sowie MMP-2 der CC 531-Tumorzellen Zellen in vitro, RT-PCR



**Abbildung 8:** Diese Abbildung zeigt das PCR-Produkt von TIMP-1, MMP-9 und MMP-2

## 5.1.2 Matrigel Invasionsassay

Zur Überprüfung der Wirksamkeit des MMP-Inhibitors Aktinonin wurden ex vivo Vorversuche mittels eines Matrigel Invasionsassays durchgeführt.

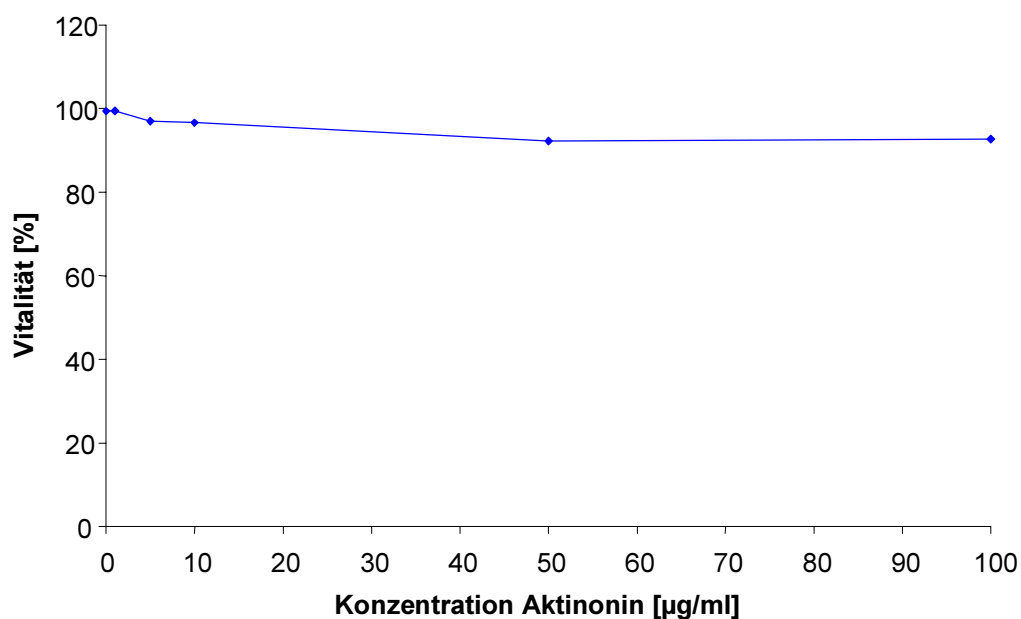
### 5.1.2.1 Vitalität (CC 531-Zellen)

Zuerst wurde die Vitalität der CC 531-Zellen überprüft, um sicher zu gehen, dass nicht aus anderen Gründen, wie z.B. Zelltod, keine Zellen durch den Filter diffundieren.

Das Ergebnis zeigt, dass die Vitalität der Zellen in keinstenweise durch Aktinonin beeinflusst wurde. Sie beträgt selbst bei der höchsten Aktinonin-Konzentration (100 µg/ml) nach 24 Stunden noch über 90 %.

Konzentration Aktinonin [µg/ml]	Vitalität der CC 531-Zellen nach 24 h [%]
0	99,34
1	99,42
5	96,94
10	96,58
50	92,19
100	92,66

**Tabelle 5:** Diese Tabelle zeigt die Vitalität der CC 531-Zellen bei steigender Konzentration von Aktinonin nach 24 Stunden



**Abbildung 9:** Graphische Darstellung des Vitalitätstests der CC 531-Zellen bei steigender Konzentration von Aktinonin nach 24 Stunden

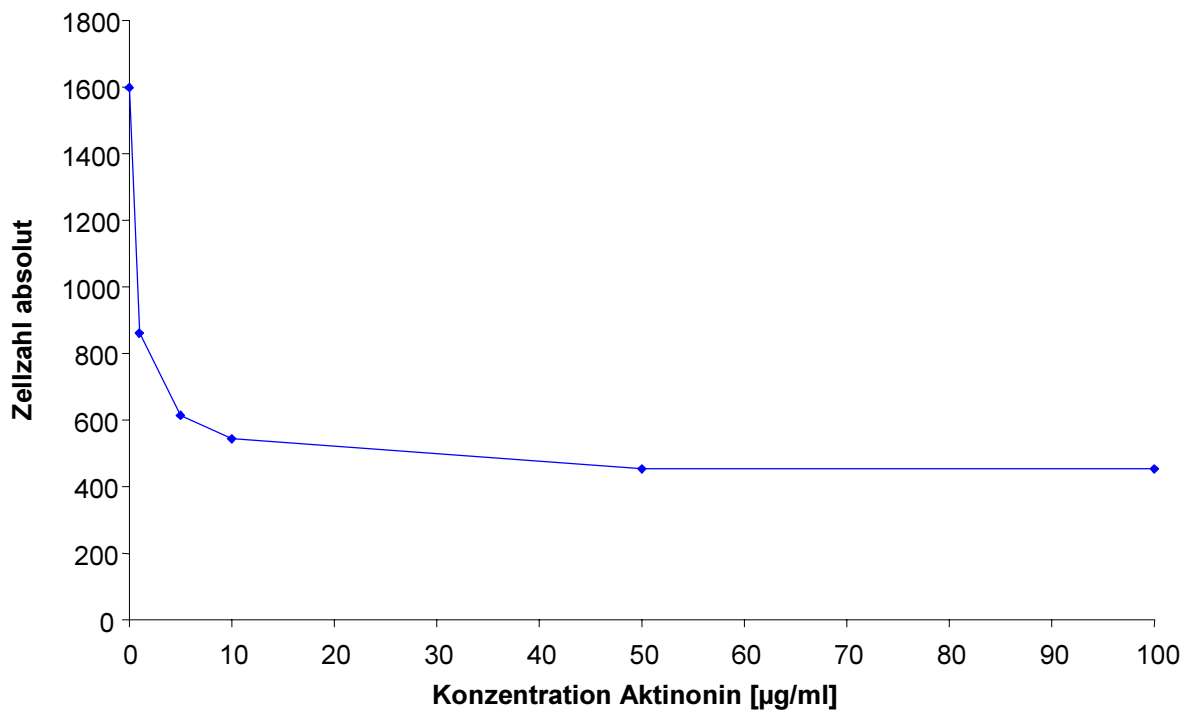
### 5.1.2.2 Invasion (CC 531-Zellen)

Anschliessend wurden Transwell-Filter mit Matrigel beschichtet und CC531-Zellen hinzugefügt. Danach erfolgte die Zugabe von Aktinonin, bzw. 10 %iger Ethanol-Saline-Lösung. Nach Inkubation, Fixierung und Färbung erfolgte die Auswertung durch das Auszählen der Zellen im Filter, welche durch das Matrigel diffundierten.

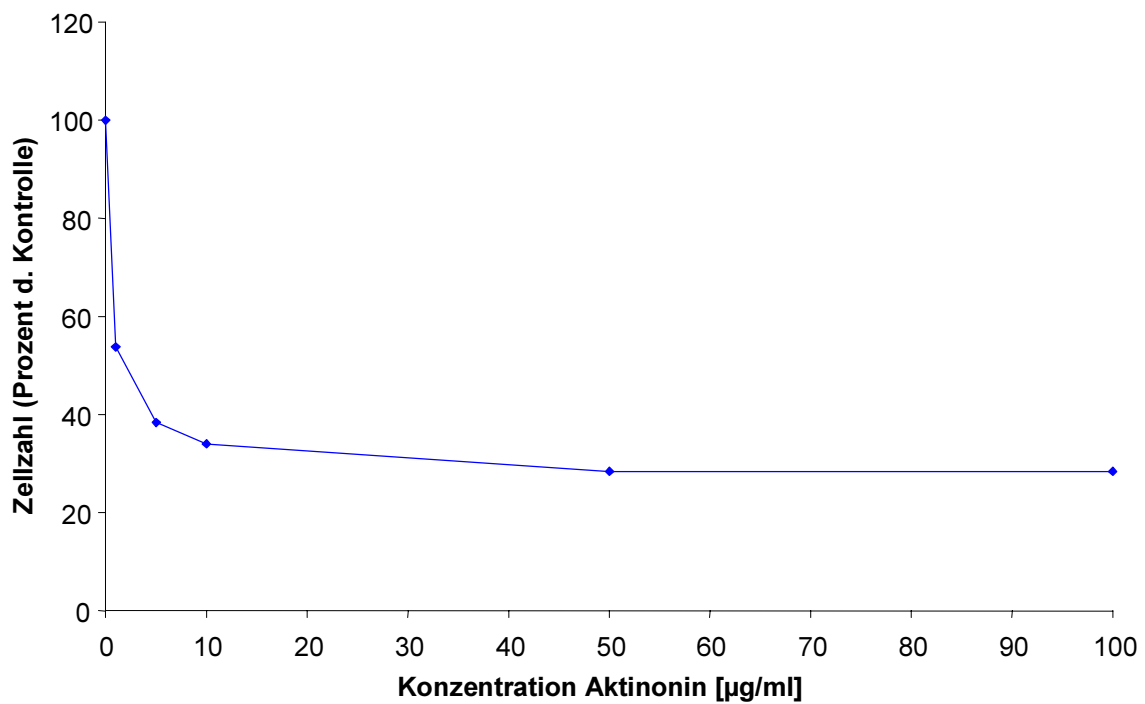
Mit steigender Konzentration von Aktinonin nahm die Zellzahl, die durch das Gel diffundierte, deutlich ab. Bei einer Endkonzentration von 100 µg Aktinonin/ml kamen nur noch 28,4 % der Gesamtzellzahl durch das Gel.

Konzentration Aktinonin [µg/ml]	Invasion der CC 531-Zellen (Mittelwert, Zellzahl absolut)	Invasion der CC 531-Zellen (Prozent der Kontrolle) [%]
0	1599,5	100,0
1	861,5	53,8
5	614,5	38,4
10	544,0	34,0
50	453,5	28,4
100	453,5	28,4

**Tabelle 6:** Diese Tabelle zeigt das Ergebnis des Matrigelinvasionsassays der CC 531-Zellen in absoluter Zellzahl und in Prozent der Kontrolle bei steigender Konzentration von Aktinonin



**Abbildung 10:** Graphische Darstellung der Invasion der CC531-Zellen durch das Matrigel bei steigender Konzentration von Aktinonin (Zellzahl absolut)



**Abbildung 11:** Graphische Darstellung der Invasion der CC531-Zellen durch das Matrigel bei steigender Konzentration von Aktinonin (Prozent der Kontrolle)

## 5.2 Makroskopische Ergebnisse (in vivo)

### 5.2.1 Makroskopie des Tumorgewebes

Unmittelbar nach der Entnahme der Leber zum Tötungszeitpunkt konnte das Tumorgewebe durch Palpation sicher intrahepatisch lokalisiert werden. Bei Untersuchung der Schnittfläche stellte sich das Tumorgewebe bei allen Gruppen und zu allen Zeiten ohne morphologische Veränderungen, als weisses Gewebe dar, das sich deutlich sichtbar vom gesunden Lebergewebe, dessen physiologische Farbe rotbraun ist, abhob.

### 5.2.2 Messung des Tumor replacements

Nach Entnahme der Leber wurde die Metastasierung in Form des Tumor replacement Modells, wie unter Punkt 4.2.9 beschrieben, beurteilt. Es erfolgte eine Schätzung des Tumor replacements anstelle einer Vermessung, weil aus Erfahrung das durch das diffuse Tumormodell entstandene Tumorgewebe nicht auszählbar ist.

Für die jeweiligen Tiere der Behandlungs- und Kontrollgruppe wurde das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der Daten berechnet.

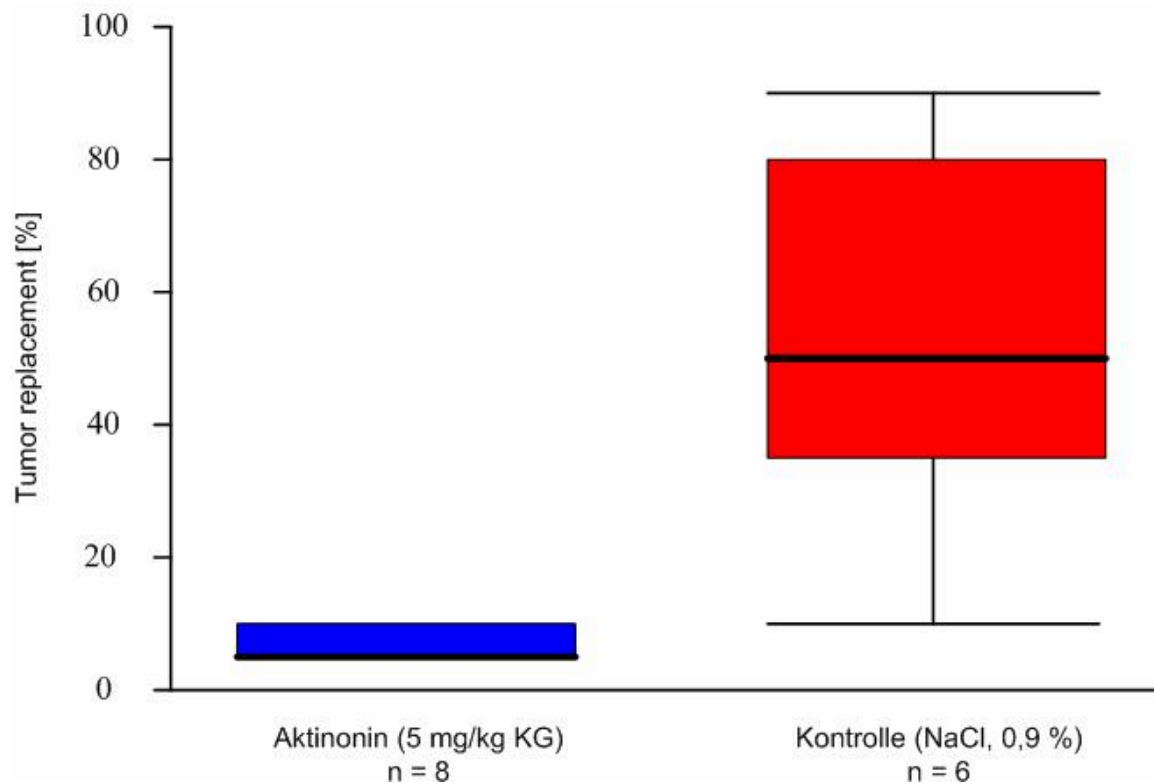
Demnach wird ersichtlich, dass 14 Tage nach der Tumorimplantation das durchschnittliche Tumor replacement mit dazugehörigem SEM-Wert im Mittel  $6,88 \pm 0,92$  % für die Behandlungsgruppe (Aktinonin) und  $52,50 \pm 12,57$  % für die Kontrollgruppe (NaCl) betrug.

	<b>Aktinonin (5 mg/kg KG) [%] n = 8</b>	<b>Kontrolle (NaCl, 0.9%) [%] n = 6</b>
Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )	6,88	52,5
Median	5	50
Standardabweichung (SD)	2,59	30,78
Standardfehler des Mittelwertes (SEM)	0,92	12,57
Bereich	0-10	10-90

**Tabelle 7:** Die Tabelle zeigt den arithmetischen Mittelwert, die Standardabweichung sowie den Standardfehler des Mittelwertes des geschätzten Tumor replacements der Behandlungs- und Kontrollgruppe

Aktinonin (5 mg/kg KG)		Kontrolle (NaCl, 0,9%)	
Tier	Tumor replacement [%]	Tier	Tumor replacement [%]
1	10	9	10
2	< 5	10	90
3	10	11	35
4	10	12	35
5	< 5	13	80
6	< 5	14	65
7	< 5		
8	< 5		

**Tabelle 8:** Die Tabelle zeigt die Daten des Tumor replacements der jeweiligen Tiere



**Abbildung 12:** Bereiche des Tumor replacement der Behandlungs- und Kontrollgruppe

### 5.2.2.1 Statistische Auswertung

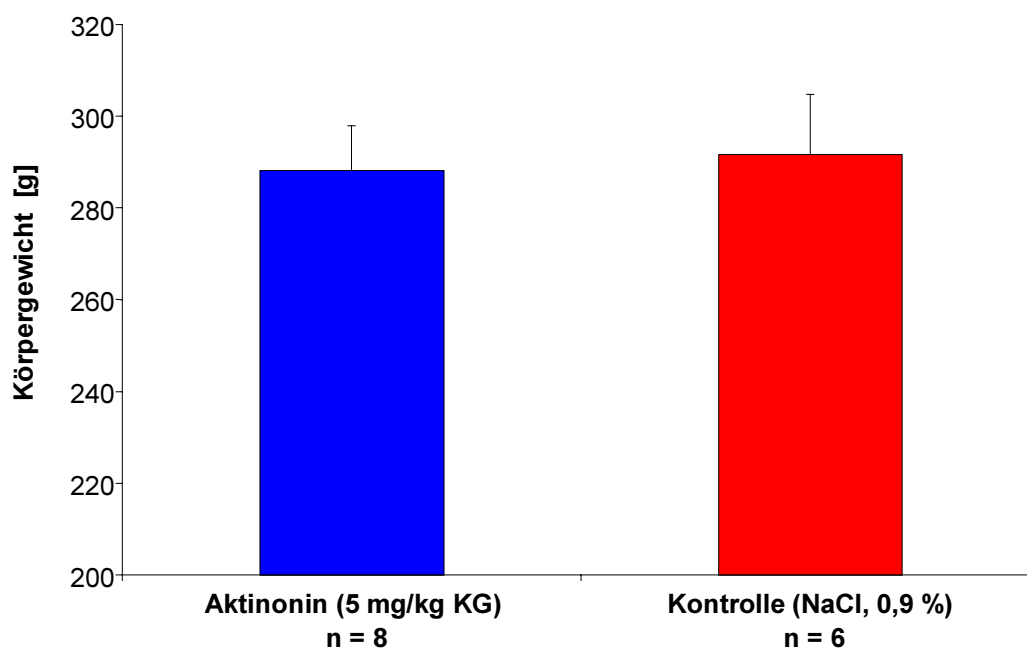
Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests wurde der Parameter Tumor replacement einer statistischen Analyse unterzogen. Bei einem Signifikanzniveau von 5 % stellt der errechnete Wert  $p = 0,003$  einen signifikanten Unterschied dar.

### 5.2.3 Messung des Körpergewichts 14 Tage nach der Tumorimplantation

Vor der Euthanasie der Tiere und Probenentnahme wurden die Tiere, wie unter Punkt 4.2.7 beschrieben, gewogen. Wieder wurden der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ), der Median, die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet. Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, betrug das durchschnittliche Körpergewicht mit dazugehörigem SEM-Wert im Mittel  $288,13 \pm 9,73$  g für die Behandlungsgruppe (Aktinonin) und  $291,67 \pm 13,02$  g für die Kontrollgruppe.

	<b>Aktinonin (5 mg/kg KG) [g] n = 8</b>	<b>Kontrolle (NaCl, 0.9%) [g] n = 6</b>
Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )	288,13	291,67
Median	292,50	287,50
Standardabweichung (SD)	27,51	31,89
Standardfehler des Mittelwertes (SEM)	9,73	13,02

**Tabelle 9** : Die Tabelle zeigt den arithmetischen Mittelwert, den Median, die Standardabweichung sowie den Standardfehler des Mittelwertes des Körpergewichtes von Behandlungs- und Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Probenentnahme



**Abbildung 13:** Dargestellt ist das arithmetische Mittel des Körpergewichts der Behandlungs- und Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Probenentnahme

### 5.2.4 Gewichtsverlauf der Versuchstiere über 14 Tage

Vom Tag der Operation („Tag 0“) an wurden die Versuchstiere die ersten 4 Tage gewogen, dann am 7. Tag und zuletzt am Tag der Probenentnahme. Es wurden für jeden Tag der Gewichtsmessung der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ), der Median, die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) für die Behandlungs- und Kontrollgruppe berechnet.

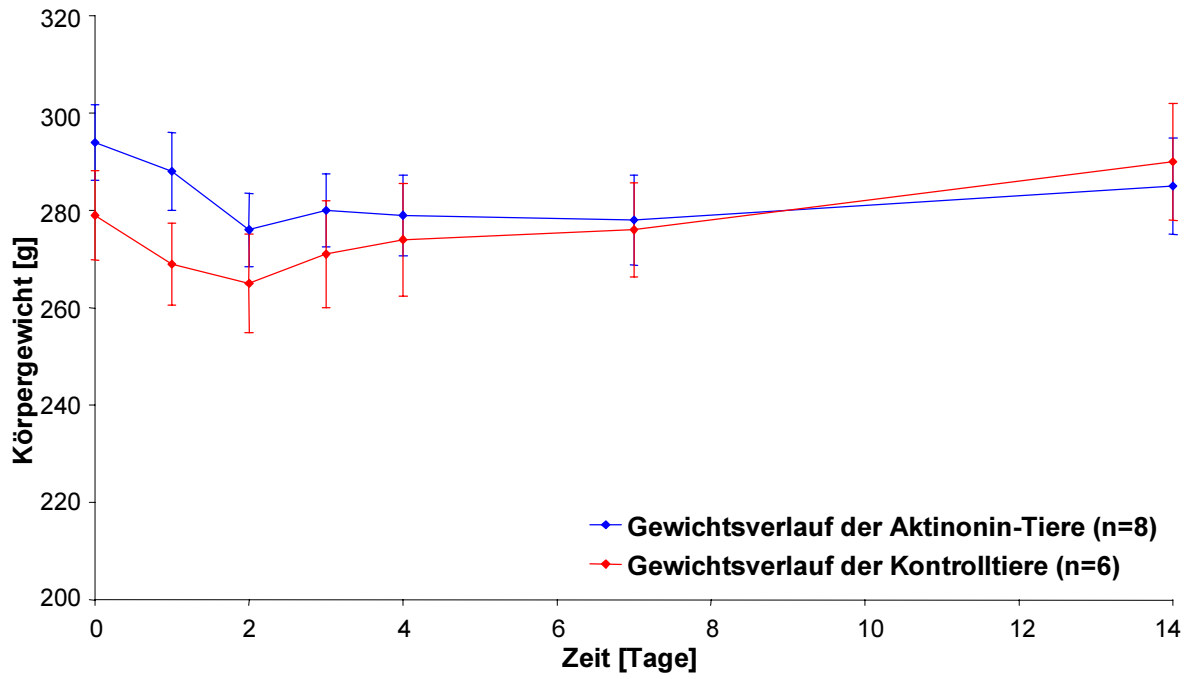
Tag	0	1	2	3	4	7	14
Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )	294	288	276	280	279	278	285
Median	300	290	270	285	280	275	285
Standardabweichung (SD)	21.91	22.65	21.28	21.21	23.42	26.10	27.95
Standardfehler des Mittelwertes (SEM)	7.75	8.01	7.52	7.50	8.28	9.23	9.88

**Tabelle 10:** Die Tabelle zeigt den arithmetischen Mittelwert, den Median, die Standardabweichung, sowie den Standardfehler des Mittelwertes des jeweiligen Tages der Gewichtsmessung in Gramm für die Behandlungsgruppe (Aktinonin)

Tag	0	1	2	3	4	7	14
Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )	279	269	265	271	274	276	290
Median	280	270	265	275	275	280	285
Standardabweichung (SD)	22,44	20,56	24,83	26,84	28,39	23,70	29,44
Standardfehler des Mittelwertes (SEM)	9,16	8,39	10,14	10,96	11,59	9,68	12,02

**Tabelle 11:** Die Tabelle zeigt den arithmetischen Mittelwert, den Median, die Standardabweichung, sowie den Standardfehler des Mittelwertes des jeweiligen Tages der Gewichtsmessung in Gramm für die Kontrollgruppe (NaCl, 0,9 %)





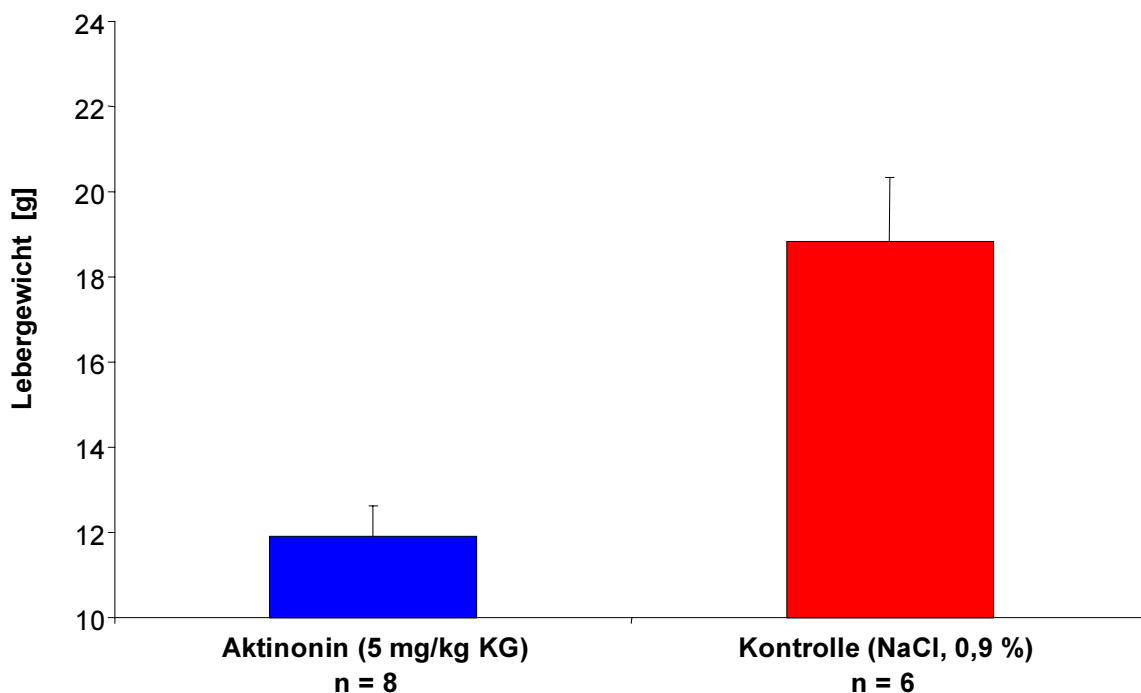
**Abbildung 14:** Graphische Darstellung des Gewichtsverlaufs im Mittel der Behandlungs- und Kontrollgruppe über 14 Tage

### 5.2.5 Messung des Lebergewichts

Nach Entnahme der Leber zum Tötungszeitpunkt wurde ausserdem die Leber als Ganzes gewogen. Es wurden der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ), der Median, die Standardabweichung (SD), sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) bestimmt. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass das durchschnittliche Lebergewicht mit dazugehörigem SEM-Wert im Mittel  $11,91 \pm 0,71$  g für die Behandlungsgruppe (Aktinonin) und  $18,83 \pm 1,50$  g für die Kontrollgruppe (NaCl) betrug.

	<b>Aktinonin (5 mg/kg KG) [g] n = 8</b>	<b>Kontrolle (NaCl, 0,9%) [g] n = 6</b>
Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )	11,91	18,83
Median	12,71	18,75
Standardabweichung (SD)	2,02	3,68
Standardfehler des Mittelwertes (SEM)	0,71	1,50

**Tabelle 12:** Die Tabelle zeigt den arithmetischen Mittelwert, den Median, die Standardabweichung, sowie den Standardfehler des Mittelwertes des Lebergewichts von Behandlungs- und Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Probenentnahme



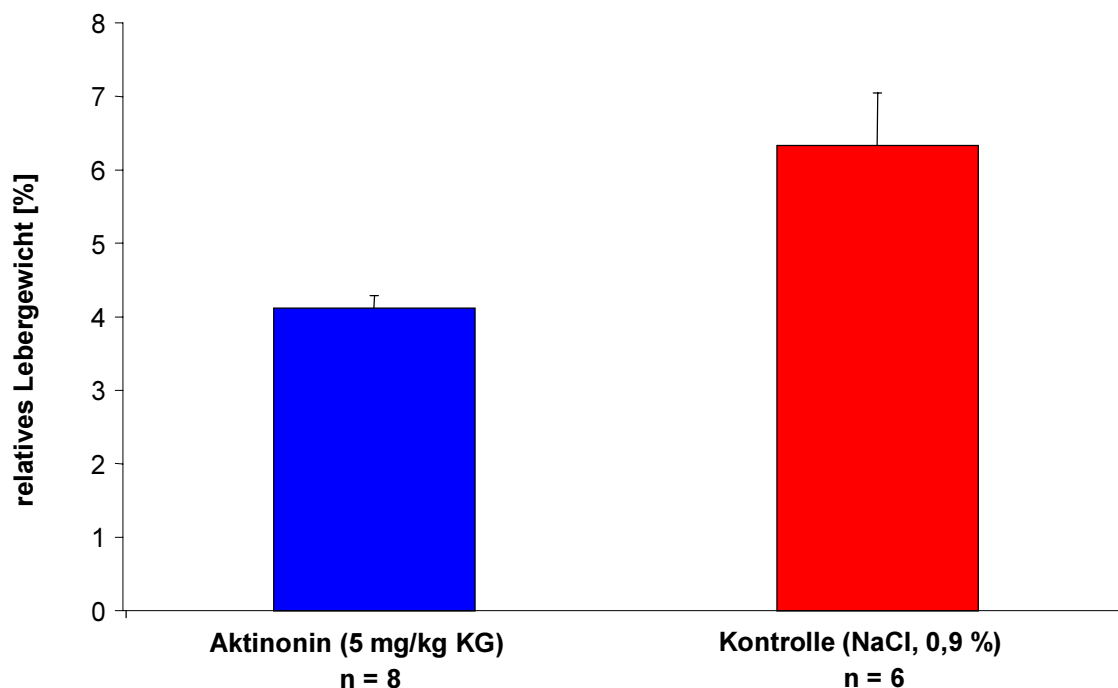
**Abbildung 15:** Dargestellt ist das arithmetische Mittel des Lebergewichts in der Behandlungs- und Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Probenentnahme

### 5.2.6 Bestimmung des relativen Lebergewichts

Das physiologische relative Lebergewicht einer Ratte beträgt 4,15 % des Gesamtkörpergewichts. Es wurde das relative Lebergewicht der Versuchstiere aus den jeweiligen Gruppen errechnet und davon jeweils der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ), der Median, die Standardabweichung (SD), sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) bestimmt.

	<b>Aktinonin (5 mg/kg KG) [%] n = 8</b>	<b>Kontrolle (NaCl, 0,9%) [%] n = 6</b>
Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )	4,12	6,33
Median	4,14	6,21
Standardabweichung (SD)	0,49	1,77
Standardfehler des Mittelwertes (SEM)	0,17	0,72

**Tabelle 13:** Die Tabelle zeigt den arithmetischen Mittelwert, den Median, die Standardabweichung, sowie den Standardfehler des Mittelwertes des relativen Lebergewichts der Behandlungs- und Kontrollgruppe



**Abbildung 16:** Dargestellt ist das arithmetische Mittel des relativen Lebergewichts in der Behandlungs- und Kontrollgruppe

### 5.2.7 Makroskopie des Tumor replacements

Zur Dokumentation der Makroskopie des Tumor replacements wurde die Leber als Ganzes und lamelliert in ca. 5 mm dicken Scheiben fotografiert.



**Abbildung 17:** Dieses Foto zeigt eine Leber im Ganzen eines Tieres (Tier 6) aus der Behandlungsgruppe mit Aktinonin (5 mg/kg KG). Das Tumor replacement betrug in diesem Fall weniger als 5 %. Der Maßstab ist in cm.



**Abbildung 18:** Auf diesem Foto ist eine lamellierte Leber desselben Tieres wie unter Abb.17, dargestellt. Der Maßstab ist in cm.



**Abbildung 19:** Dieses Foto zeigt eine Leber im Ganzen eines Tieres (Tier 13) aus der Kontrollgruppe mit NaCl (0,9 %). Das Tumor replacement betrug hier 80 %. Der Maßstab ist in cm.



**Abbildung 20:** Auf diesem Foto ist eine lamellierte Leber desselben Tieres wie unter Abb. 19, dargestellt. Der Maßstab ist in cm.

### 5.2.8 Peritonealkarzinose

Eine Peritonealkarzinose wurde in keiner der beiden Gruppen 14 Tage postinterventionell festgestellt.