

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

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Der Einfluss einer intravenösen vs. intraperitonealen Applikation
von Emodin und BTB 14431 auf fortgeschrittenes intra- und extraperitoneales
Tumorstadium bei Ratten**

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

vorgelegt von

Maria Gall
Tierärztin
aus Bernau bei Berlin

Berlin 2014

Journal-Nr.: 3721

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Chris Braumann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Diese Dissertation entstand mit Förderung durch die Berliner Krebsgesellschaft e.V.

Deskriptoren (nach CAB Thesaurus):

rats, animal model, colorectal cancer, Emodin, intravenous injection, intraperitoneal injection, dosage

Tag der Promotion: 15. November 2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielstellung	1
1.1	Gefäßbildung.....	3
1.1.1	Tumor Dormancy und „angiogenic switch”	3
1.1.2	Angiogenese und der <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF).....	4
1.2	Inhibitoren der Angiogenese.....	6
1.2.1	Prinzipien der Antiangiogenese - etablierte Angiogenesehemmer.....	6
1.2.2	Emodin.....	7
1.2.3	BTB 14431	11
1.2.4	Emodin und BTB 14431 und der Einfluss des CSN und seiner Kinasen auf die VEGF-induzierte Angiogenese	12
1.3	Das Kolorektale Karzinom.....	16
1.3.1	Epidemiologie und Inzidenz.....	16
1.3.2	Ätiopathogenese	18
1.3.3	Klassifikation, Prognose, Therapie	19
2.	Material und Methodik	21
2.1	Das Tiermodell.....	21
2.1.1	Die Versuchstiere.....	21
2.1.2	Die Tierhaltung und Tierpflege	21
2.2	Die Zelllinie	22
2.3	Das Studiendesign	23
2.3.1	Übersicht.....	23
2.3.2	Die Randomisierung.....	24
2.3.3	Die Tumorimplantation und die Operationsmethodik	24
2.4	Die Herstellung der Lösungen von Emodin und BTB 14431	27
2.5	Die Behandlung.....	27
2.6	Die Obduktion und die Bestimmung des Tumorgewichts.....	27
2.7	Die Dokumentation und die statistische Auswertung	28
3.	Ergebnisse	29
3.1	Nebenwirkungen	29
3.2	Intravenöse Applikation von Emodin und BTB 14431	30
3.2.1	Die Tumorgewichte	30
3.2.2	Die Änderungen des Körpergewichts der Tiere	33
3.3	Intraperitoneale Applikation von Emodin und BTB 14431	36
3.3.1	Die Tumorgewichte	36
3.3.2	Die Änderungen des Körpergewichts der Tiere	39

3.4	Die intravenöse und intraperitoneale Therapie im Vergleich.....	42
3.4.1	Die Tumorgewichte	42
3.4.2	Die Körpergewichte	47
4.	Diskussion	52
4.1	Tumorgewichte und der Einfluss von Dosissteigerungen	52
4.2	Mortalität, Veränderungen des Gewichts der Tiere und Toxizität.....	55
4.3	Unterschiede zur Behandlung direkt nach Zellapplikation	58
4.4	Folgerungen und Ausblick	59
5.	Zusammenfassung	63
6.	Summary	65
7.	Abbildungsverzeichnis	66
8.	Tabellenverzeichnis	68
9.	Literatur	70
	Danksagung	82
	Selbstständigkeitserklärung.....	83

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil	ip	intraperitoneal
abd	abdominal	iv	intravenös
AKT	Protein Kinase B	JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
APC	Adenomatöse Polyposis Coli		
AP-1	Aktivator Protein 1	KAI	CD82 (cluster of differentiation 82)
ATF	Activating Transcription Factor	KG	Körpergewicht
ATP	Adenosintriphosphat	KID	Krebsinformationsdienst
BAI-1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	K-ras	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
Bad	Bcl-2-associated Death Promoter	LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
Bak	Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
Bax	Bcl-2-associated X protein	MVD	Microvessel Density
Bcl-2	B-cell Lymphoma-2	MMP	Matrix-Metalloproteinasen
Bcl-XL	B-cell Lymphoma-Extra Large	NEM	Nahrungsergänzungsmittel
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor	NF-κB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells
BMI	Body Mass Index		
BTB 14431	9,10-Dihydroxy-1,4-Dihydroanthracene-1,4-Dion	NOXA	PMAIP1, Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
CAM	Cell Adhesion Molecule	NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
CEA	Carcinoembryonales Antigen	PCK2	Proteinkinase CK2
CK2	Casein Kinase 2	PDGF	Platelet Derived Growth Factor
COX	Cyclooxygenase	PGF	Placenta Growth Factor
COP9	Constitutive Photomorphogenesis 9	PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinases
CRC	Colorectal Carcinoma	PKD	Proteinkinase D
CSN	COP9 - Signalosom	PVP	Polyvinylpyrrolidon
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum	ROS	Reactive Oxygen Species
DMSO	Dimethylsulfoxid	SMAD4	homologes Protein aus "mothers against decapentaplegic gene" (MAD) und "small body size gene" (SMA)
DR5	Death Receptor Five, Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 10b	TCF	T-cell specific transcription factor
EGF	Epidermal Growth Factor	TG	Tumorgewicht
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	TNF	Tumornekrose Faktor
ERK	Extracellulär Signal Regulated Kinases	TNM	Classification of Malignant Tumors
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis	TRAIL	TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand
FasR	FAS receptor, CD95 (Cluster of Differentiation 95), Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 6	TSP-1	Thrombospondin 1
FasL	Fas ligand	Ub	Ubiquitin
FGF	Fibroblast growth factor	UICC	Union Internationale Contre Le Cancer
HIF	Hypoxie Induzierter Faktor	UPS	Ubiquitin-26S-Proteasom-System
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	VPF	Vascular Permeability Factor
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration	WCR	World Cancer Report
		XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

1. Einleitung und Zielstellung

Jährlich sterben weltweit 7,6 Millionen Menschen an Krebs. Das Kolorektale Karzinom ist dabei der dritthäufigste maligne Tumor. Es zeigt eine hohe Sterblichkeitsrate in fortgeschrittenen Stadien [104]. Die Therapie des Kolorektalen Karzinoms umfasst, je nach Stadium, eine chirurgische Resektion des primären Tumorgewebes und eine adjuvante Chemotherapie, um bereits gestreute Zellen zu bekämpfen. Bewährte Chemotherapeutika weisen häufig eine Vielzahl an Nebenwirkungen auf, die zum Teil die Lebensqualität der Patienten stark beeinflussen. Eine noch sehr junge, neue Gruppe von Therapeutika, die Angiogenesehemmer, versprechen eine verbesserte Verträglichkeit bei gleichzeitiger Wirkungssteigerung.

Ein funktionelles Netzwerk aus Blutgefäßen bildet in Geweben die Grundlage für die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie für den Abtransport von Stoffwechselprodukten. Ohne Gefäßversorgung können Tumore nicht über eine bestimmte Größe (\varnothing 10-100 mm) hinaus wachsen [50]. Einen entscheidenden Punkt im Wachstum und der Metastasierung von Tumoren stellt somit die Angiogenese dar, der komplexe Vorgang der Gefäßneubildung aus bereits bestehenden Gefäßen. Seit Judah Folkman 1971 postulierte, dass das Tumorwachstum abhängig von der Angiogenese sei und dies einen therapeutischen Ansatz darstellen könnte [48; 49], ist die Angiogenese im Fokus der Tumorforschung. Antiangiogenetika sollen die Gefäßentwicklung hemmen und so das Tumorwachstum unterbinden. 2004 wurde der erste antiangiogene Wirkstoff (Bevacizumab) gegen das metastasierende Kolorektale Karzinom zugelassen. Dabei handelt es sich um einen humanen Monoklonalen Antikörper, der den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) neutralisiert [44]. Weitere Substanzen folgten und die komplexen Vorgänge der Angiogenese bieten eine Vielzahl von Angriffspunkten und therapeutischen Möglichkeiten [163].

Die VEGF-induzierte Angiogenese wird unter anderem durch die zwei Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun gesteuert. Durch die Hemmung spezifischer Kinasen wird ihr Abbau oder die Stabilisierung kontrolliert und so die Expression von VEGF und die Tumorangiogenese beeinflusst [15]. Emodin und BTB 14431 sind zwei Anthraquinone, die Einfluss auf den Abbau und die Stabilisierung von p53 und c-Jun haben. Emodin ist ein bekannter Kinase-Inhibitor. BTB 14431 ist ein strukturell verwandtes Anthraquinon. Der Effekt dieser beiden Substanzen auf das Wachstum von Tumoren fortgeschrittener Größe *in vivo* soll in dieser Arbeit untersucht werden.

Im Einzelnen soll im vorliegenden Tierversuch der Einfluss einer intravenösen vs. intraperitonealen Applikation der Substanzen Emodin und BTB 14431 in steigenden Konzentrationen auf das intra- und extraperitoneale Wachstum von Tumoren

fortgeschrittener Größe bei Ratten untersucht werden. Die intraperitoneale Applikation einer Tumorzellsuspension soll das intraoperative Zurückbleiben bzw. Freiwerden von vitalen Tumorzellen bei Resektion eines Kolorektalen Karzinoms simulieren. Eine Fernmetastase soll durch eine subkutane Applikation der Tumorzellsuspension in den Nacken simuliert werden.

In einem vorangegangenen Experiment der Arbeitsgruppe wurden die Tiere direkt nach der Applikation der Zellsuspension für sieben Tage intermittierend in einem 12-stündigen Rhythmus behandelt. Es konnte keine antineoplastische Wirksamkeit von Emodin und BTB 14431 gezeigt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen soll in dem vorliegenden Tierexperiment durch einen verzögerten Behandlungsbeginn die antineoplastische Wirkung von Emodin und BTB 14431 auf fortgeschrittene Tumorstadien des Kolonadenokarzinomtyps gezeigt werden. Diese sind bereits vaskularisiert und besitzen somit im Gegensatz zu dem angewendeten früheren Modell eine Gefäßversorgung. Die parenteral applizierten Substanzen sollen so die Tumore in wirksamer Dosis erreichen.

Um die Effekte einer steigenden Dosis von Emodin und BTB 14431 zu untersuchen, werden diese in je zwei unterschiedlichen Konzentrationen appliziert. Emodin wird in den Dosierungen 2,5 und 5 mg/kg Körpergewicht (KG) und BTB 14431 in den Dosierungen 0,3 und 1,7 mg/kg KG angewendet. Es soll sowohl die Applikationsart (intravenös vs. intraperitoneal) als auch der Wirkungsort (abdominale Tumore und subkutane Tumore) in Hinblick auf die Tumorgewichte und die Gewichtsentwicklung der Tiere verglichen werden.

Folgende Fragestellungen sollen untersucht werden:

1. Gibt es einen Einfluss von Emodin und BTB 14431 auf das intra- und extraperitoneale Tumorgewicht und gibt es einen Unterschied zwischen intravenöser und intraperitonealer Behandlung? Welchen Einfluss haben Dosissteigerungen von Emodin und BTB 14431?
2. Gibt es einen Einfluss von Emodin und BTB 14431 auf die Gewichtsentwicklung und Mortalität der Tiere und gibt es einen Unterschied zwischen intravenöser und intraperitonealer Behandlung?
3. Gibt es Unterschiede zu dem vorangegangenen Tierexperiment, welches die Effekte beider Substanzen bei Behandlung unmittelbar nach Zellapplikation untersuchte?

1.1 Gefäßbildung

In der Embryonalentwicklung differenzieren sich aus spezifischen mesodermalen Vorläuferzellen, sogenannten Angioblasten, die Endothelzellen. Diese bilden die innerste Wandschicht jeden Blut- und Lymphgefäßes. Die Differenzierung der Angioblasten zu einem primären funktionellen Blutgefäßsystem bezeichnet man als Vaskulogenese. Dieser Neubildung von Blutgefäßen, auch *de novo* Blutgefäßbildung genannt, steht die Sprossung aus bereits bestehenden Blutgefäßen, die Angiogenese, gegenüber. An der Sprossung von Blutgefäßen sind insbesondere die extrazelluläre Matrix, die Basalmembran und die Endothelzellen beteiligt. Die Angiogenese läuft in genau definierten Schritten, der sogenannten angiogenen Kaskade, ab und wird im Wesentlichen von der Migration der Endothelzellen bestimmt. Zunächst müssen sich diese aus ihrem Zellverband lösen. Die extrazelluläre Matrix und die vaskuläre Basalmembran werden durch die Einwirkung von Metalloproteinasen aufgelöst [69; 121]. Durch die eröffnete Basalmembran migrieren die Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus. Die Endothelzellen proliferieren, verlängern dadurch den endothelialen Strang und bilden gefäßähnliche Strukturen [137]. Eine weitere Form der Angiogenese ist die nichtsprossende Angiogenese oder auch Intussuszeption genannt. Ein bestehendes Gefäß wird hierbei längs gespalten, wodurch ein komplexes vaskuläres Netzwerk entsteht. Die sich gegenüberliegenden Endothelwände migrieren zueinander und formen einen intraluminalen vertikalen Pfeiler, sodass es zur Verbindung der sich gegenüberliegenden Endothelzellen kommt. [19; 37; 39].

1.1.1 Tumor Dormancy und „angiogenic switch“

Bis zu einer bestimmten Größe findet die Versorgung eines Tumors durch Diffusion aus dem umliegenden Gewebe statt. Ab einem Durchmesser von 10-100 µm benötigt der Tumor ein eigenes Gefäßnetz, um sich ausreichend mit Nährstoffen versorgen zu können und den Abtransport von Stoffwechselprodukten zu gewährleisten [51]. Die Theorie der Abhängigkeit des Tumorwachstums von der Angiogenese wurde erstmals 1971 von Judah Folkman [48] aufgestellt und hat seitdem einen großen Einfluss auf die Angiogenese- und Tumorforschung.

Genetische und epigenetische Faktoren führen zu neoplastischen Transformationen von Zellen und zur Entstehung von avaskulären Zellhaufen. Diese sogenannten „dormant tumors“ können über sehr lange Zeit bestehen bleiben, solange proangiogene (u.a. VEGF, bFGF) und antiangiogene (u.a. Thrombospondin-1, Angiostatin, Endostatin und *Platelet Factor 4*) Faktoren im Gleichgewicht sind. Überwiegen jedoch die proangiogenen Faktoren, kommt es zum sogenannten „angiogenic switch“ [12; 127]. Der kritische

Durchmesser bis zu dem ein solider Tumor heranwachsen kann, bevor es zum „angiogenic switch“ kommt, beträgt 1-2 mm. Dies ist durch die biophysikalischen Eigenschaften des Sauerstoffs bedingt. Dieser kann rund 100 µm in Gewebe diffundieren [131]. Um den Tumor ausreichend zu versorgen, müsste der Abstand zwischen zwei Blutgefäßen dadurch maximal 200 µm betragen.

Die meisten erwachsenen Menschen haben mikroskopisch kleine, nicht vaskularisierte Tumore in mehr als einem Organ [14]. Davon entwickelt sich aber nur etwa einer von 600 zu einem malignen Tumor mit eigenem Gefäßsystem [53]. Sobald der Tumor durch eigene Blutgefäße versorgt wird, steigt seine Wachstumsrate signifikant an. Die *Microvessel Density* (MVD) wurde in einer Reihe von Studien mit der Invasivität und Aggressivität von Tumoren in Beziehung gesetzt und dient als prognostischer Faktor für das Überleben der Patienten [16; 74; 86; 113].

Durch den „angiogenic switch“ erlangen die Tumore Anschluss an das Gefäßsystem des Organismus. Dies ist eine entscheidende Voraussetzung für die Streuung von Tumorzellen.

1.1.2 Angiogenese und der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

Im adulten Organismus findet Angiogenese physiologisch bei wenigen Prozessen statt. Dazu gehört die Wundheilung [91], das Wachstum des *Corpus Luteum* und die Erneuerung der Endometriumsschleimhaut der Frau im Rahmen des Menstruationszyklus [8; 123] sowie das Wachstum der Milchdrüse während der Gravidität [117] und die Haarfollikelbildung [47; 183]. Daraus ergibt sich ein günstiges therapeutisches Fenster für Angiogeneseinhibitoren.

Die komplexen Vorgänge der Angiogenese werden durch eine Reihe von Molekülen vermittelt und koordiniert. Zu den Stimulatoren der Angiogenese gehören unter anderem angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF (Platelet Derived Growth Factor) und Angiopoietin-1 und -2, hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin und Enzyme wie Angiogenin. Inhibitorisch hingegen wirken z.B. proteolytische Peptide wie Angiostatin und Endostatin sowie extrazelluläre Matrixmoleküle wie Thrombospondin. Des Weiteren sind verschiedene Zytokine, Chemokine und Hormone an der Regulation der Angiogenese beteiligt. Sie alle stellen potentielle selektive Targets für eine antiangiogene Therapie dar [150].

Der wichtigste und wohl am besten erforschte Faktor bei der sprossenden Angiogenese ist VEGF. Die VEGF-Familie umfasst mindestens sechs Faktoren: VEGF-A bis -F, wobei VEGF-A in der Regel nur mit VEGF bezeichnet wird. Beim Menschen spielen VEGF-A bis -D eine Rolle bei der Angiogenese. VEGF verwandte Angiogenesefaktoren sind PGF-1 und -2 (*Placenta Growth Factor*) [45]. Die Wirkung von VEGF ist sehr fein gesteuert und wird durch

VEGF-Rezeptoren vermittelt, die von Endothelzellen exprimiert werden [134].

1983 entdeckten Senger *et al.* [155] ein Protein, das in der Lage war, die Permeabilität der Endothelzellen zu erhöhen. Dieses damals als Vascular Permeability Factor (VPF) bezeichnete Protein wurde sechs Jahre später erneut durch Ferrara und Henzel [46] identifiziert und als Wachstumsfaktor für Vaskuläre Endothelzellen bezeichnet. VEGF fördert Gefäßwachstum und -umbildung und stellt einen entscheidenden Stimulus zum Überleben von Endothelzellen dar [56]. Fehlen solche Stimuli werden die Endothelzellen apoptotisch. VEGF ist also essentiell für das Überleben neugebildeter Gefäßsysteme [7]. Des Weiteren ist VEGF in der Lage, die Gefäßpermeabilität zu erhöhen [128], wodurch Plasmaproteine durch die Gefäßwand diffundieren können und sich eine extrazelluläre Matrix bilden kann. Dadurch wird das Wachstum von Endothelzellen unterstützt [169]. Außerdem induziert VEGF als chemotaktischer Faktor unter anderem die gerichtete und einem Konzentrationsgradienten folgende Bewegung von Endothelzellen [30].

Die Expression von VEGF wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie der *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Tumor Necrosis Factor* (TNF) und Interleukin-1 können die Expression ebenso beeinflussen wie genetische Determinanten und das umgebende Milieu. Hypoxiegradienten sorgen in Tumoren für die sauerstoffabhängige Produktion von VEGF [144] und die Ausschüttung des Hypoxie Induzierten Faktors (HIF). HIF ist ein Transkriptionsfaktor, der je nach Hydroxylierung seiner α -Untereinheit vermehrt abgebaut wird, oder die Expression von Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF induziert. Die Hemmung von HIF-1 α beeinträchtigt z.B. das Tumorwachstum bei humanen Magenkarzinomzellen (TMK-1) [165] und führt zur verminderten Ausschüttung von VEGF und einer geringeren Zahl an Blutgefäßen bei humanen Myelomzellen [166]. Da die Prozesse der Tumorangiogenese jedoch nicht koordiniert ablaufen, kommt es zur Ausbildung eines chaotischen Gefäßnetzes anstelle normal strukturierter Blutgefäße [19; 79]. VEGF führt nur in der exakten Konzentration zur Ausbildung eines morphologisch normalen und voll funktionsfähigen Gefäßnetzes [9].

1.2 Inhibitoren der Angiogenese

1.2.1 Prinzipien der Antiangiogenese - etablierte Angiogenesehemmer

Das Wachstum eines Tumors ist im Wesentlichen von seiner Versorgung mit Blutgefäßen abhängig. Die mittlere Gefäßdichte in den meisten humanen Tumoren liegt zwischen $75/\text{mm}^2$ und $110/\text{mm}^2$ [92]. Die MVD spiegelt die mittlere interkapilläre Distanz wieder. Eine hohe MVD korreliert in den meisten Fällen mit einer schlechten Prognose [68]. Je geringer die Gefäßdichte und je höher die interkapilläre Distanz ist, desto schlechter wird das Tumorgewebe mit Nährstoffen versorgt und desto eher kommt es zu Nekrosen und zu einer Verringerung der Tumormasse. Sinkt die Mikrogefäßdichte auf unter $50/\text{mm}^2$, kommt es zu einer signifikant höheren Nekrosebildung innerhalb der Tumore [92]. Das Ziel der antiangiogenen Tumorthherapie ist es also, die Mikrogefäßdichte zu reduzieren und somit die interkapilläre Distanz zu erhöhen. Dies führt zur Einschränkung der Versorgung des Tumors, das weitere Wachstum wird vermindert und im Idealfall kommt es zu einer Rückbildung des Tumorgewebes.

Judah Folkman postulierte bereits in den 1970er Jahren, dass die Antiangiogenese eine ernstzunehmende Möglichkeit der Tumorbehandlung ist [49].

2004 erhielt der erste zuverlässig validierte Angiogeneseinhibitor die klinische Zulassung zur Behandlung fortgeschrittener kolorektaler Tumore. Bevacizumab ist ein neutralisierender VEGF-Antikörper und verbessert das Gesamtüberleben sowie auch das progressionsfreie Überleben erkrankter Patienten besonders in Kombination mit einer Standardchemotherapie signifikant und ist dabei gut verträglich [75; 151]. Bei Patienten, die Resistenzen gegen konventionelle Chemotherapeutika zeigten, war Bevacizumab in der Lage, in 83 % der Fälle zu einem Therapieerfolg und zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit zu führen, wenn es in Kombination angewandt wurde [58].

2012 folgte Aflibercept, ein rekombinantes Fusionsprotein, das als spezifischer Inhibitor des VEGF-A und -B wirkt und auch den PGF bindet. Es wird als Chemotherapie in Kombination mit Irinotecan, 5-Fluorouracil und Folinsäure verabreicht und ist für die Behandlung des Kolorektalen Karzinoms bei Progress nach, oder Resistenz gegen eine Therapie mit Oxaliplatin zugelassen. Die Wirksamkeit konnte in ersten klinischen Studien bewiesen werden. Aflibercept zeigte dabei jedoch eine hohe Rate an schweren Nebenwirkungen und toxizitätsbedingten Therapieabbrüchen [2].

1.2.2 Emodin

Emodin ist ein Anthraquinon, das in natürlicher Form in Rhabarber vorkommt. Rhabarber hat ein nachgewiesenes toxikologisches und antineoplastisches Potential und ist eine der ältesten und bekanntesten chinesischen Medizinalpflanzen [70]. Er ist heute immer noch Bestandteil verschiedener pflanzlicher Präparate zur traditionellen Nutzung als Laxativ, bei gastrointestinalen Hämorrhagien und Ulcera. Die meistgenutzten Spezies des Rhabarbers sind *Rheum palmatum* aus der Familie der Knöterichgewächse (*Polygonaceae*) und *Rheum officinale* Baill, der chinesische Rhabarber. Für beide Arten wird der Begriff Medizinalrhabarber verwendet. Wesentliche bioaktive Bestandteile von Rhabarber sind Anthraquinon-Derivate wie Emodin, Aloe-Emodin, Rhein und andere [18]. Die chemischen Strukturen der Anthraquinone in diesen Pflanzen sind sehr ähnlich, die Bioaktivität und die molekularen Ansatzpunkte hingegen unterschiedlich. Die chemische Struktur von Emodin unterscheidet sich leicht von den anderen Anthraquinonen (Abb. 1). Entscheidend für seine Wirkung ist die dritte Hydroxylgruppe [153].

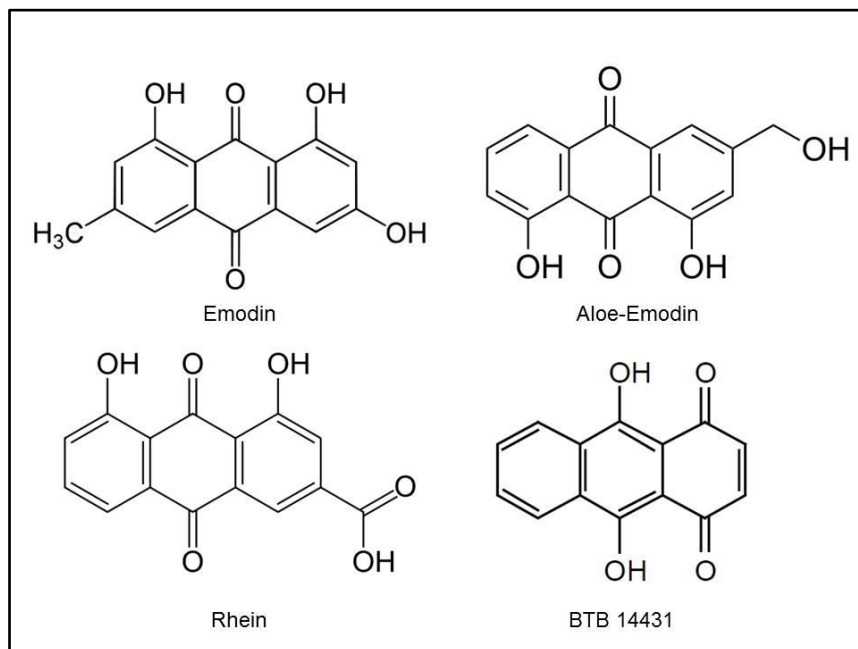


Abb. 1: Die chemische Struktur von Emodin, Aloe-Emodin, Rhein & BTB 14431 (modifiziert nach Füllbeck *et al.* 2005 [55])

Im 19. Jhd. postulierte Rudolph von Virchow erstmals die Rolle der Entzündung bei der Karzinogenese [152]. Besonders chronische Entzündungen wirken bei der Entstehung von Krebs mit und haben einen erheblichen Anteil bei der Tumolvaskularisation [4; 6]. Eine

Pankreatitis oder Kolitis steigern das Risiko, an Krebs zu erkranken, enorm. Emodin hat antiinflammatorisches Potential [161]. Ende des 20. Jhd. wurde die antiinflammatorische Wirkung von Emodin erstmals nachgewiesen. Entzündungen wie akute Cholangitis, akute Appendizitis und rheumatoide Arthritis wurden mit Emodin behandelt [32; 64]. Des Weiteren wurde in den 70er und 80er Jahren Emodin erstmals als zytotoxischer Wirkstoff bei lymphoiden und murinen Leukämiezellen (P-388 bzw. L1210) beschrieben [87; 96].

Emodin zeigt folgende verschiedene Wirkmechanismen, die für die Therapie von Tumoren interessant sind:

Hemmung des Zellwachstums

Die Hemmung des Zellwachstums scheint durch die Kohlenstoffatome C1 und C3 vermittelt zu sein [21; 23; 95; 157; 200]. Emodin hat eine 25fach höhere Zytotoxizität auf transformierte Bronchialepithelzellen im Vergleich zu normalen Bronchialepithelzellen [22]. Normale Zellen scheinen resistenter gegenüber der durch Emodin induzierten Toxizität zu sein. Diese Spezifität auf maligne Zellen liegt möglicherweise an der Wirkung von Emodin auf onkogene Signaltransduktion, die in Krebszellen tätig oder sogar verstärkt ist [23].

Unterbrechung des Zellzyklus

Normalerweise regulieren sich Zellen bei Schäden über verschiedene Wege, um sich vor genomischer Instabilität oder Toxizität bei geschädigter DNA zu schützen. Bestimmte Proteine, sogenannte Checkpoint-Proteine, kontrollieren dabei den Zellzyklus. In der Tumorgenese verlieren Tumorzellen ihre Checkpoint-Proteine, was die Tumorentwicklung möglich macht [38]. Die Zellzyklusregulation ist daher ein wichtiger Therapieansatz. Der Effekt von Emodin auf die G2/M-Phase konnte an verschiedenen Zelllinien gezeigt werden, wie zum Beispiel an Leberkrebszellen [94], Leukämiezellen [24] und neuroektodermalen Zellen [138]. Zu einem G2/M-Arrest führt Emodin ebenso bei humanen Kolonkarzinomzellen (LS1034) und hemmt das Wachstum von mit dieser Zelllinie bestückten Xenografts bei Nacktmäusen [115]. Auch ein G1/S-Zyklusarrest konnte unter anderem bei Leberkrebszellen [94], Gliom-Zellen [1], Lungenkrebszellen [190] und auch Kolonkarzinomzellen [84] nach Behandlung mit Emodin nachgewiesen werden. Bei humanen Leberkrebszellen (HepG2) führt Emodin zu einem G0/G1-Zellzyklusarrest [196].

Apoptoseinduktion

Ein weiterer Wirkmechanismus von Emodin ist die Apoptoseinduktion. Apoptose ist fundamental in der Entwicklung von komplexen biologischen Systemen. Dysregulation oder Fehler führen zu einer Transformation und Wachstum von Tumorzellen oder begünstigen

dies. Apoptose ist der programmierte Zelltod, bei dem die betroffenen Zellen ohne Entzündungsreaktionen und ohne Veränderungen der Struktur des umliegenden Gewebes zerfallen und abgebaut bzw. aufgenommen werden [164]. Die Apoptose teilt sich in zwei Phasen, die Initiations- und die Effektorphase. Die Initiationsphase kann als Apoptose Typ I (extrinsischer Weg) oder als Apoptose Typ II (intrinsischer Weg) ablaufen. DNA-Schäden aktivieren den Transkriptionsfaktor p53 (siehe auch 1.2.4 Emodin und BTB 14431 und der Einfluss des CSN und seiner Kinasen auf die VEGF-induzierte Angiogenese). Dies führt zur Aktivierung des intrinsischen Weges der Apoptose. Proapoptotische Proteine wie z.B. Bax, Bak, Bad und Noxa werden dabei induziert, während antiapoptotische Proteine wie Bcl-2, Mcl, XIAP und Survivin gehemmt werden [124; 133; 189]. Das Membranpotential wird gestört, was zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytoplasma führt. Cytochrom c bildet zusammen mit dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 einen Komplex, der zur Aktivierung der Caspase-Kaskade führt [187]. p53 kann ebenfalls den extrinsischen Weg durch Induktion der Expression von Rezeptoren der TNF-Superfamilie wie FasR und DR5 und ihrer Apoptose induzierenden Liganden FasL und TRAIL aktivieren [160; 171].

Die Apoptose als potentieller Mechanismus der antiproliferativen und antineoplastischen Wirkung von Emodin wurde bereits mehrfach beschrieben [26; 143; 167; 191]. Die Regulation der Apoptose ist gut erforscht. Verschiedene Studien beschreiben die durch Emodin induzierte Caspase-3, Caspase-8 und Caspase-9 vermittelte Apoptose [26; 107; 195]. Die Bcl-2 Proteinfamilie beinhaltet antiapoptotische (Bcl-2 und Bcl-XL) und proapoptotische (Bax und Bak) Proteine. Emodin erhöht die Bax- und Bak-Ausschüttung signifikant [82; 102]. Bcl-2 ist ebenfalls involviert. Zunächst führt Emodin zu einem signifikanten Abfall, dann führt ektopische Bcl-2 Expression jedoch zu einer Blockierung der durch Emodin induzierten Apoptose [167]. Des Weiteren führt Emodin über verschiedene Mechanismen zu einer Akkumulation von p53 [55; 157; 173]. Bei humanen Leberkrebszellen fördert Emodin die vermehrte Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytosol, die Aktivierung von Caspase-8 und -9, steigert die Expression von p53 und hemmt die Heterodimerisation von Bcl-2 mit Bax und führt so auf verschiedenen Wegen zur Apoptose der Zellen [196].

Antimetastatische und antiangiogene Wirkung

Die hohe Sterblichkeit, die mit Krebs assoziiert ist, wird durch die hämatogene und lymphogene Metastasierung von Tumorzellen begründet. Metastasierung besteht aus vier wesentlichen Schritten. Nach der Angiogenese des Primärtumors kommt es zur Abtrennung von Tumorzellen. Diese gelangen nach Abbau der extrazellulären Matrix per Zellinvasion und -adhäsion auf hämatogenem oder lymphogenem Weg in andere Organe und

prolifrieren dort [47].

Emodin hemmt die TNF- α -induzierte Expression von Adhäsions-Proteinen, die für Zelladhäsion, Migration und Inflammation essentiell sind [93]. Die Anheftung verschiedener Krebszellen an Proteine der extrazellulären Matrix wird durch Emodin über die Zerstörung der Membranlipidschicht signifikant gehemmt [73]. Die Membranlipidschicht ist bei Krebs- und normalen Zellen unterschiedlich. In Krebszellen besteht sie z.B. aus mehr Cholesterol und gesättigten Fettsäuren. Emodin beeinträchtigt die Integrität dieser veränderten Lipidschicht und führt so zu einer Hemmung der Adhäsion von Krebszellen [54; 120]. Die Invasivität humaner Krebszellen wird durch Unterdrückung der MMP-9-Expression sowie durch Hemmung der AP-1 und NF- κ B-Signalwege gehemmt [71; 89; 168; 203]. Emodin hemmt des Weiteren die EGF-induzierte Zellmigration [72].

Emodin kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Tumorangio-genese hemmen. Es supprimiert unter anderem die Expression Angiogenese-assoziiertes Faktoren wie MMP-1 und MMP-9 durch die Hemmung der NF- κ B- und AP-1-Signalwege [33; 103; 108]. Kaneshiro *et al.* konnten 2006 die antiangiogene Wirksamkeit von Emodin *in vitro* an humanen Nabelvenenzellen (HUVECs) und *in vivo* in einem *Air Sac Assay* an Mäusen nachweisen. Die MMP-9-Expression der HUVECs sowie die Phosphorylierung der *Extracellular signal-regulated Kinasen* 1 und 2 (ERK 1/2), die zu den MAP-Kinasen gehören, nahm im *Air Sac Assay* dosisabhängig ab [85]. Des Weiteren ist Emodin in der Lage, die VEGF-Expression direkt und indirekt zu hemmen [108; 168]. Die indirekte Hemmung wird über die nukleare Translokation sowie die DNA-Bindung von NF- κ B vermittelt, das ein wichtiger Transkriptionsfaktor zur Kontrolle der MMP-2/9 und VEGF-Expression ist [168].

Ljubimov *et al.* zeigten 2004, dass Emodin in der Lage ist, retinale Neovaskularisation in einem sauerstoffinduzierten Retinopathie-Modell zu hemmen. Hauptsächlich durch die Hemmung der Casein Kinase 2 (CK2) zeigt Emodin dabei protektive Effekte gegen Angiogenese und die retinale Neovaskularisation [112]. Es stabilisiert *in vitro* retinale Endothelzelltubuli auf der Basalmembran und hemmt Zellmigration und -proliferation. Außerdem bedingt Emodin einen G2/M-Zellarrest in bovinen aortalen Gefäßendothelzellen sowie einen G1-Arrest in humanen umbilikalen Endothelzellen und hemmt VEGF-A-induzierte Angiogenese [97; 181]. Emodin wurde erstmals 1999 durch Yim *et al.* als spezifischer Inhibitor der CK2 erwähnt [192]. Sie beschrieben, dass Emodin ein kompetitiver Hemmer der CK2 mit Konkurrenz zu ATP ist. Uhle *et al.* zeigten 2003, dass Emodin außerdem die Proteinkinase D inhibiert [173]. Mittels der Hemmung dieser beiden CSN-assoziierten Kinasen und der Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun, hat Emodin einen Einfluss auf die VEGF-Produktion und somit die Angiogenese.

1.2.3 BTB 14431

Um neue pharmakologische Substanzen zu identifizieren, werden große Datenbanken anhand struktureller und chemischer Eigenschaften bereits bekannter Stoffe mittels *in silico* Screening durchsucht. Diese neuen Substanzen besitzen ähnliche physikochemische und biologische Eigenschaften wie die bereits bekannten Stoffe, die als Leitstruktur dienen und deren biologische Aktivität oder Bindung an ein Zielprotein bereits bekannt ist [34; 41; 111]. Dies ist eine sehr moderne Art der Vorselektion von Wirkstoffen und unterstützt eine Reduktion der Tierzahlen im Tierversuch. Ein solches Screening wurde 2005 durch Füllbeck *et al.* mit Curcumin und Emodin durchgeführt [55]. Die dabei identifizierte Substanz 9,10-dihydroxy-1,4-dihydroanthracene-1,4-dione (BTB 14431) wurde in diesem Zusammenhang in *in vitro* Untersuchungen an menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa-Zellen) und an murinen Fibroblasten (B8-Zellen) charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Emodin als auch BTB 14431 die Phosphorylierung der an das CSN-assoziierten Kinasen CK2 und PKD hemmen und in Tumorzellen die intrazelluläre Konzentration von p53 steigt, während die Konzentration von c-Jun abfällt. p53 löst Apoptose aus und die geringere Konzentration an c-Jun führt indirekt zu einer Hemmung der Angiogenese [15; 55; 173].

BTB 14431 führt dabei stärker zur Apoptose von Zellen als Emodin. Des Weiteren senkt BTB 14431 in einer Konzentration von 20 µmol die Zahl der vitalen Zellen um bis zu 25%. Somit konnte ein antineoplastisches Potenzial von BTB 14431 nachgewiesen und die antineoplastische Wirkung von Emodin bestätigt werden.

Pohlentz untersuchte BTB 14431 2010 erstmalig *in vivo* [142]. Sie arbeitete dabei mit einem Tumorsuspensionsmodell, bei dem das intraoperative Freiwerden von Zellen bei Tumorresektion simuliert werden sollte. Unmittelbar nach der intraperitonealen Instillation mittels medianer Laparotomie sowie subkutaner Injektion von humanen Kolonkarzinomzellen (CC-531) wurde eine intermittierende 7-tägige Behandlung begonnen. Zweimal täglich, in einem Abstand von zwölf Stunden, wurde je nach Randomisierung eine intraperitoneale oder intravenöse Injektion von Emodin bzw. BTB 14431 durchgeführt. Die intravenöse Behandlung erfolgte über die *Vena jugularis externa* mittels eines Portsystems. Es wurden verschiedene Dosen gegenübergestellt. BTB 14431 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen untersucht: 0,3 mg/kg, 1,7 mg/kg und 3,3 mg/kg KG. Emodin wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen untersucht: 5 mg/kg und 10 mg/kg KG. Bei der Obduktion drei Wochen nach Behandlungsende konnte die antineoplastische Wirksamkeit von Emodin und BTB 14431 nicht bestätigt werden.

1.2.4 Emodin und BTB 14431 und der Einfluss des CSN und seiner Kinasen auf die VEGF-induzierte Angiogenese

Die VEGF-induzierte Angiogenese wird unter anderem durch die zwei Transkriptionsfaktoren p53 und c-Jun gesteuert. Durch die Hemmung spezifischer Kinasen, die an das CSN (*Constitutive Photomorphogenesis 9 Signalosom*, COP9-Signalosom) assoziiert sind, wird ihr Abbau oder die Stabilisierung kontrolliert. Emodin und BTB 14431 sind zwei Anthraquinone, die Einfluss auf diesen Prozess haben.

p53

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der in gesunden Zellen nur in sehr geringer Konzentration vorhanden ist und an definierte Stellen der DNA bindet. Kommt es zu Schäden in der DNA, wird p53 rasch stabilisiert, vermindert abgebaut und dadurch akkumuliert [119; 158]. p53 beeinflusst dann die Regulation der Expression bestimmter Gene, die an der Kontrolle des Zellzyklus und der DNA-Reparatur beteiligt sind. Dies kann zum Zellzyklusarrest und schließlich zur Apoptose der Zelle führen, wenn die DNA nicht repariert werden kann [61; 178]. Diese Fähigkeit brachte p53 die Bezeichnung „Wächter des Genoms“ ein [99; 105]. Des Weiteren wirkt das Protein als Tumorsuppressor und kann so die Transformation von Zellen durch Onkogene neutralisieren [178]. Ein aktives p53 in Tumorzellen kann also unbegrenztes Wachstum verhindern und Apoptose auslösen [61; 178]. Die Umgehung des programmierten Zelltods ist eines der wichtigsten Merkmale von neoplastischen Zellen. In den meisten Tumoren wird mutiertes p53 überexprimiert [60; 77].

Des Weiteren beeinflusst aktives p53 die Tumorangio-genese und Metastasierung, indem es die Expression von angiogenesefördernden Faktoren hemmt, die antiangiogenen Signalwege stimuliert und das sogenannte *Hypoxia-Sensing-System* inhibiert [124]. Hierbei spielen unter anderem Faktoren wie HIF, VEGF, COX-2, TSP-1 und BAI-1 auch eine wichtige Rolle. Außerdem hemmt p53 die Metastasierung von Tumorzellen, indem es die Expression verschiedener verantwortlicher Gene, die zum Beispiel für EGFR und bFGF codieren, hemmt, während Suppressorgene wie TSP-1 und KAI1 durch den Einfluss von p53 vermehrt exprimiert werden [13; 25; 31; 36; 116; 185].

c-Jun

c-Jun ist die Bezeichnung eines Gens, das als Protoonkogen fungiert und gleichzeitig als Transkriptionsfaktor wirkt. Die gleiche Bezeichnung trägt auch das Protein, für das das Gen c-Jun codiert. Dieses Protein ist DNA-bindend und verhält sich als Onkoprotein, da es die Transkription wichtiger Gene aktiviert, die wachstumsstimulierende Proteine codieren. Die Protoonkogene werden vermehrt transkribiert, wenn das Wachstum normaler Zellen stimuliert wird. Dies ist ein Hinweis auf die Beteiligung der von diesen Genen codierten

Proteine bei der Wachstumsregulation [156].

Zusammen mit c-Fos und ATF-Proteinen bildet c-Jun den frühen Transkriptionsfaktor AP-1. AP-1 ist auf verschiedene Weise an der Tumorigenese beteiligt. Es ist in der Lage, die extrazelluläre Matrix zu verändern, fördert die Zellproliferation und -differenzierung, ist an der Apoptose aber auch dem Überleben neuer Zellen beteiligt und fördert die Angiogenese sowie die Metastasierung von Tumoren [27; 40; 179]. Außerdem ist es an der Regulation von Entzündungsvorgängen beteiligt, deren Einfluss auf die Tumorentstehung bereits bestätigt ist [3; 118]. Die Wirkung von AP-1 und c-Jun wird über den MAPK- und JNK-Signalweg vermittelt [156]. Die intrazelluläre Konzentration des Transkriptionsfaktors c-Jun hat Einfluss auf die Produktion von VEGF und somit auch auf die Tumorangiogenese [177].

Das COP9-Signalosom und das Ubiquitin-System

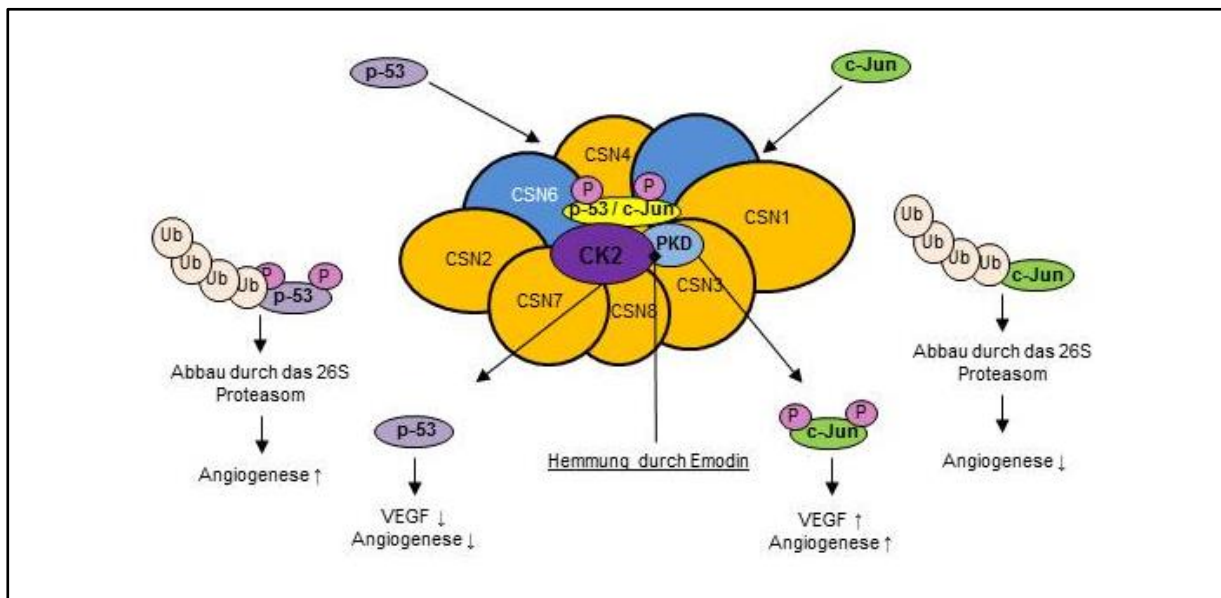


Abb. 2: Der Einfluss des CSN und seiner Kinasen auf die VEGF-induzierte Angiogenese: Wird die Phosphorylierung gehemmt kommt es zur Inhibierung der Angiogenese. (Ub = Ubiquitin; P = Phosphatgruppe; CK2 = Casein Kinase 2, PKD = Proteinkinase D) (modifiziert nach Braumann *et al.* 2008 [15])

Das *Constitutive Photomorphogenesis 9 Signalosom*, kurz COP9-Signalosom oder CSN, ist ein intrazellulärer multifunktionaler Protein-Komplex. Es besteht aus 8 Untereinheiten und weist Sequenzhomologien mit dem 26S-Proteasom Komplex auf [66]. Das 26S-Proteasom ist Teil des Ubiquitin-Systems, über das ein Großteil der Proteolyse in eukaryotischen Zellen abläuft [67]. Die ubiquitinabhängige Proteolyse ist der entscheidende Zwischenschritt für die Wirkung antiangiogener Substanzen. Ein konjugiertes Enzym katalysiert die Bildung einer Peptidbindung zwischen Ubiquitin und der Aminogruppe an der Seitenkette eines Lysinrestes an einem Zielprotein [29]. Weitere Ubiquitinmoleküle lagern sich an und bilden

eine Ubiquitinkette aus zahlreichen Molekülen. Man nimmt an, dass diese Kette das markierte Protein zum 26S-Proteasom dirigiert, wo das Protein in viele kleine Peptidfragmente gespalten wird. Die zahlreichen Proteasomen, die im Cytosol vorkommen, spalten ubiquitinmarkierte Proteine in einer ATP-abhängigen Reaktion, bei der Peptide und intakte Ubiquitinmoleküle entstehen [140].

Will man nun die Konzentration eines bestimmten Proteins, das ubiquitinabhängig abgebaut werden kann, in der Zelle erhöhen oder verringern, kann man es durch Phosphorylierung gegenüber dem Ubiquitin-System stabilisieren oder den Abbau fördern.

Der Abbau bzw. die Stabilisierung verschiedener Substrate wird mittels assoziierter Kinasen durch das CSN kontrolliert (siehe Seite 13, Abb. 2). p53 und c-Jun werden über die CK2 und die Proteinkinase D (PKD) phosphoryliert [173]. p53 wird durch die CK2 phosphoryliert und daraufhin ubiquitinabhängig durch das 26S-Proteasom vermehrt abgebaut. Die CK2 ist eine hochkonservierte und in Zellen weitverbreitete Serin-/Threoninkinase. Sie phosphoryliert bestimmte physiologische Substrate und spielt so eine wichtige Rolle bei Zellproliferation, -transformation und -differenzierung [135; 174]. c-Jun wird durch die PKD phosphoryliert und dadurch gegenüber dem Ubiquitin/26S-Proteasom stabilisiert [130; 173]. Die PKD gehört zur Unterfamilie der CAM-Kinasen. Diese sind Ca^{2+} /Calmodulinabhängige Protein-Kinasen, die wiederum, ebenso wie die CK2, zu den Serin-/Threonin-spezifischen Proteinkinasen gehören [149]. Die PKD spielt eine Rolle beim intrazellulären Proteintransport am *trans*-Golgi-Netzwerk und der Regulation von Proliferation und Apoptose. Für die CSN-vermittelte Phosphorylierung und den Abbau der Proteine ist vermutlich die Untereinheit CSN5 verantwortlich. CSN5 interagiert direkt mit c-Jun und p53 [139]. p53 hemmt die VEGF-Produktion und c-Jun fördert diese [199]. Dass das Prinzip der Hemmung des Signalosom-Systems einen vielversprechenden Ansatz darstellt, wird durch Daten unterstützt, die zeigen, dass die mit dem Signalosom assoziierten Proteinkinasen CK2 und PKD u.a. durch Curcumin, Emodin und auch BTB 14431 inhibiert werden können [11; 55]. Dadurch steigt die Menge an p53 und auf der anderen Seite kommt es zu einem rapiden Abbau von c-Jun durch das Ubiquitin-26S-Proteasom-System (UPS). Das geänderte Verhältnis von p53 zu c-Jun führt zu einer verringerten Expression von VEGF und dadurch zur Hemmung der Angiogenese.

Mittels der IC50 (mittlere inhibitorische Konzentration) kann man die Wirksamkeit von Substanzen miteinander vergleichen. Sie gibt die Konzentration eines Inhibitors an, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Je niedriger die IC50 ist, desto wirksamer ist also der Inhibitor. BTB 14431 ist ein besserer Inhibitor für die CK2 und Emodin ein besserer Inhibitor für CSN (siehe Tab. 1) [55].

	IC50 CK2 (µmol)	IC50 PKD (µmol)	IC50 CSN (µmol)
Emodin	22,7	94,5	4,4
BTB 14431	6,4	68,9	21,0

Tab. 1: Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) von Emodin und BTB 14431

1.3 Das Kolorektale Karzinom

1.3.1 Epidemiologie und Inzidenz

Die folgenden wissenschaftlichen Daten über das Kolorektale Karzinom wurden hauptsächlich aus dem World Cancer Report 2008 [104], der GLOBOCAN [43] und dem Bericht über Krebs in Deutschland 2012 [57] entnommen.

Jährlich gibt es weltweit 12,4 Millionen neue Krebsfälle, Tendenz steigend. Davon gehen rund 1,15 Millionen (9,4 %) auf das Kolorektale Karzinom zurück. Somit liegt es nach Lungenkrebs (1,52 Millionen) und Brustkrebs (1,29 Millionen) an dritter Stelle der weltweiten Krebsneuerkrankungen. Die Zahlen der organspezifischen Krebserkrankungen beziehen sich bei nicht näherer Benennung des Tumors auf alle histologischen Subtypen. Bei 90 % der Krebserkrankungen im Kolon- und Rektumbereich handelt es sich um ein Adenokarzinom. Betrachtet man die Geschlechter getrennt voneinander, nimmt das Kolorektale Karzinom bei Männern nach Lungen-, Prostata- und Magenkrebs die vierte Stelle, bei Frauen nach Brust- und Gebärmutterhalskrebs die dritte Stelle ein. Das Kolonkarzinom verteilt sich bei Männern und Frauen gleich, das Rektumkarzinom ist bei Männern häufiger als bei Frauen. Insgesamt gehen jedes Jahr weltweit 7,6 Millionen Todesfälle auf Krebs zurück. Das Kolorektale Karzinom liegt dabei mit 8 % nach Lungenkrebs (18 %), Magenkrebs (10 %) und Leberkrebs (9 %) an vierter Stelle. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate des Kolorektalen Karzinoms lag 2008 dank immer besserer Therapiemöglichkeiten bei etwa 50 %, wobei dies regional und tumorstadienabhängig unterschiedlich ist.

In Deutschland steht Darmkrebs bei beiden Geschlechtern an zweiter Stelle bei Inzidenz (13,5% bei Frauen, 14,3 % bei Männern) und Mortalität (13 % bei Frauen, 11,8 % bei Männern) der Krebserkrankungen. Eine höhere Inzidenz hat bei Männern nur Prostatakrebs mit 25,7 % und bei Frauen Brustkrebs mit 32,1 %. Eine höhere Mortalität hat bei Männern Lungenkrebs mit 25,5 % und bei Frauen ebenfalls Brustkrebs mit 17,2 %.

Über die Hälfte der weltweiten Krebsneufälle pro Jahr und 60 % der durch Krebs induzierten Todesfälle verteilen sich auf die Entwicklungsländer. Beim Kolorektalen Karzinom hingegen ist sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität in den westlichen Ländern der Erde (Neuseeland, Australien, Nordamerika, Europa, Japan) höher. Diese vergleichsweise hohe Inzidenz in den westlichen Ländern im Vergleich zu den Entwicklungsländern in Asien und Afrika wirft die Frage nach der Ursache auf. Die Entstehung eines Kolorektalen Karzinoms wird durch Umwelteinflüsse, hereditäre Faktoren und dietätische Aspekte begünstigt [65; 76]. Eine Reihe von Studien belegt den Einfluss der Ernährung und des Lebensstils auf die

Inzidenz des Kolorektalen Karzinoms. Einwanderer aus einem Land mit niedriger Inzidenz (z.B. Entwicklungsländer in Afrika oder Südamerika) in ein Land mit hoher Inzidenz (Industriestaaten wie Westeuropa und Nordamerika) erwerben nach nur einer Generation die Inzidenz des Gastlandes [154]. Unter anderem haben Alkoholkonsum und körperliche Bewegung einen beträchtlichen Einfluss auf die Inzidenz des Kolorektalen Karzinoms. Alkoholkonsum führt bei Männern zu einem überzeugend erhöhten Risiko, am Kolorektalen Karzinom zu erkranken. Bei Frauen ebenfalls zu einem wahrscheinlich erhöhten Risiko. Menschen mit einem *Body Mass Index* (BMI) von über 30 im Vergleich zu einem BMI von 25 haben ein um 40 % erhöhtes Risiko, an einem Kolonkarzinom zu erkranken [76]. Auch die Art der Ernährung hat einen entscheidenden Einfluss auf die Inzidenz des Kolorektalen Karzinoms. So führt vermehrter Konsum von rotem sowie verarbeitetem Fleisch und eine ballaststoffarme Ernährung zu einem erhöhten Risiko [83].

Die folgende Übersicht fasst positive wie negative Einflüsse auf die Entstehung eines Kolorektalen Karzinoms bei Männern und Frauen zusammen.

Faktoren, die das Risiko, am Kolorektalen Karzinom zu erkranken, verringern		Faktoren, die das Risiko, am Kolorektalen Karzinom zu erkranken, erhöhen	
Faktor	Grad des Einflusses	Faktor	Grad des Einflusses
Körperliche Bewegung	beträchtlich	Rotes Fleisch	beträchtlich
Ballaststoffreiche LM	wahrscheinlich	Verarbeitetes Fleisch	beträchtlich
Knoblauch	wahrscheinlich	Alkoholische Getränke Männer	beträchtlich
Milch	wahrscheinlich	Hoher Anteil an Körperfett	beträchtlich
Kalzium aus NEM	wahrscheinlich	Hoher Anteil an Bauchfett	beträchtlich
Fisch	begrenzt	Körpergröße (Erwachsene)	beträchtlich
Vitamin D-haltige LM	begrenzt	Alkoholische Getränke Frauen	wahrscheinlich
Früchte	begrenzt	LM mit Eisen	begrenzt
Nicht-stärkehaltige Gemüse	begrenzt	Käse	begrenzt
Selenhaltige LM	begrenzt	LM mit tierischen Fetten	begrenzt
Selen aus NEM	begrenzt	LM mit Zucker	begrenzt
Folathaltige LM	begrenzt		

Tab. 2: Faktoren, die das Risiko, an Kolorektalem Karzinom zu erkranken, erhöhen oder verringern. NEM = Nahrungsergänzungsmittel; LM = Lebensmittel (Modifiziert nach WCRF/AICR [148])

1.3.2 Ätiopathogenese

Vom Adenom zum Karzinom

Die Pathogenese des Kolorektalen Karzinoms ist gut erforscht. Die Akkumulation einzelner Faktoren über Jahre hinweg führt zu einer Expansion der Stammzellen in den Dickdarmkrypten, was schließlich zur Ausprägung eines Adenoms oder Karzinoms führt. Das Adenom der Dickdarmschleimhaut (Dickdarmpolyp) ist die tumoröse Vorstufe. Dabei handelt es sich um eine meist in das Darmlumen hineinwachsende epitheliale Proliferation, die mit dem Verlust der zellspezifischen Differenzierung und Strukturveränderungen der Drüsen einhergeht [154]. Morson beschrieb bereits 1974 den Zusammenhang zwischen dem Dickdarmadenom und dem Kolorektalen Karzinom [126].

Das Kolorektale Karzinom entsteht anfänglich durch einen mehrstufigen Prozess, der vor allem durch Veränderungen im Ablauf der Zellproliferation mit Verlust der Wachstumsregulierung gekennzeichnet ist. Unter Einbeziehung verschiedener genetischer Veränderungen kommt es zur sequentiellen Bildung von prämaligen Läsionen (Adenom-Karzinom-Sequenz) [122]. Obwohl bei diesem Prozess eine Vielzahl an Genen mutiert, ist jedoch nur ein geringer Teil dieser mutierten Gene an der gesteigerten Tumorprogression beteiligt [188]. Ein erstes Modell zur kolorektalen Karzinogenese veröffentlichten Fearon und Vogelstein bereits 1990 [42]. Sie postulierten, dass die histopathologische Umwandlung von einem Adenom zum Karzinom mit einer Akkumulation genetischer Veränderungen einhergeht, die zu einem Wachstumsvorteil von klonalen Zellhaufen führt. Dieses Modell dient immer noch zur Einordnung von frühen und späten genetischen Veränderungen.

Onkogene und Tumorsuppressorgene

Verschiedene Onkogene und Tumorsuppressorgene und Veränderungen in deren Signalwegen sind bei der Entstehung des Kolorektalen Karzinoms beteiligt, fünf davon besonders häufig. Das APC (Adenomatöse Polyposis Coli)-Gen, das p53-Gen und das SMAD-Gen sind Tumorsuppressor-Gene. K-RAS und β -Catenin sind Onkogene [42]. Veränderungen im APC-Gen sind für die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) verantwortlich [122]. Es kodiert für das APC-Protein, das im Wnt/Catenin-Signalweg für die Degradation von β -Catenin verantwortlich ist [17; 101]. Kommt es zu Mutationen am APC-Gen akkumuliert β -Catenin und bildet einen Proteinkomplex mit dem T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor (TCF). Dies führt zur Aktivierung spezifischer Gene und so zu vermehrtem Tumorwachstum [125]. Die FAP ist zwar äußerst selten, hat jedoch ein hohes erbliches Potential. Patienten mit unbehandelter FAP erkranken nahezu immer an einem Kolonkarzinom.

SMAD führt über p15 und p21 zu einem Zellzyklusarrest. Mutationen stören diesen anti-proliferativen Effekt [198]. Eine Zellprogression wird auch durch Mutationen im K-RAS-Gen induziert [146].

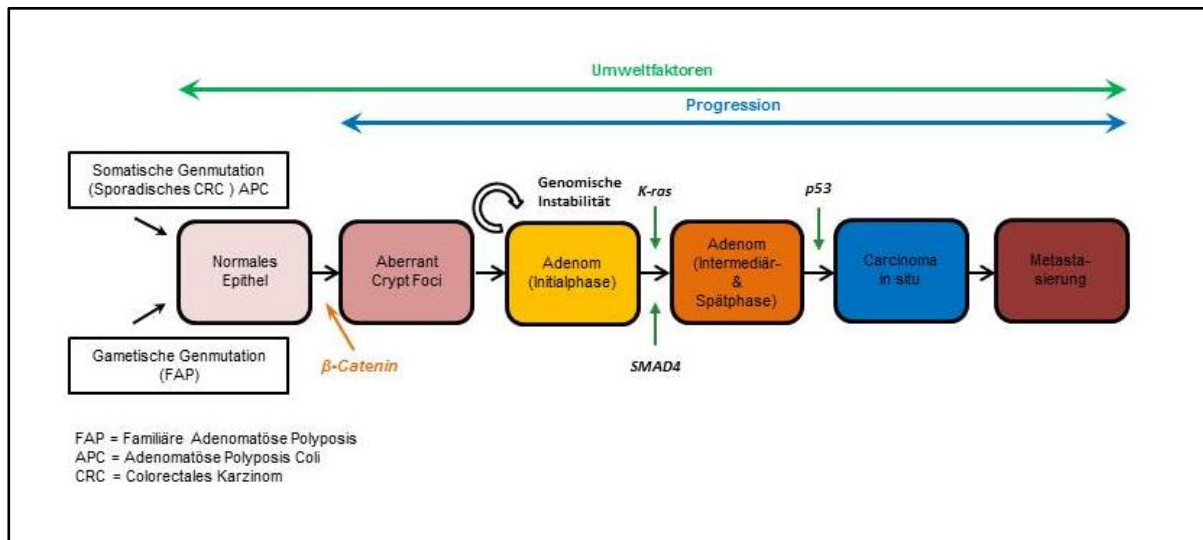


Abb. 3: Kolorektale Tumorigenese (modifiziert nach Mishra *et al.* 2005 [122])

In Adenomen sind häufig frühe genetische und epigenetische Veränderungen wie APC- oder RAS-Mutationen oder auch DNA-Hypomethylierungen zu finden. p53-Mutationen hingegen treten meist erst bei Übergang zu den genetisch instabilen Karzinomen auf und sind die häufigsten Mutationen in Tumoren [42].

Patienten mit einem Hereditären Nicht Polypösen Kolorektalen Karzinom (HNPCC) entwickeln zwar in gleichem Maße wie die Normalbevölkerung benigne Polypen, diese entarten jedoch aufgrund einer gesteigerten Mutationsrate deutlich häufiger. Fehler in den sogenannten *Mismatch*-Reparaturgenen führen zur Mikrosatelliteninstabilität. Patienten mit einer unbehandelten HNPCC erkranken zu 80-90 % an Darmkrebs [175].

1.3.3 Klassifikation, Prognose, Therapie

Eine Möglichkeit der Stadieneinteilung von Tumoren ist die TNM-Klassifikation. Sie richtet sich nach der Invasivität des Primärtumors (T), nach der lymphogenen Metastasierung (N) und nach der Fernmetastasierung (M) [186]. Die Klassifikation gilt nur für Karzinome, wodurch eine histologische Diagnosesicherung erforderlich ist. Die Stadieneinteilung orientiert sich an der Tiefe der Infiltration in die fünf Schichten des Darmwandgewebes: *Tunica mucosa*, *Tela submucosa*, *Tunica muscularis*, *Tela subserosa* und *Tunica serosa*. Des Weiteren sind die Beteiligung der regionären Lymphknoten und die hämatogene Metastasierung ausschlaggebend.

Die Prognose wird im Wesentlichen durch die systemische Metastasierung bestimmt. Das durch die TNM-Klassifizierung zugeordnete Stadium kann als prognostischer Faktor genutzt werden. Die 5-Jahres-Überlebensraten von Patienten mit Kolorektalem Karzinom liegen für das UICC-Stadium I bei 93,2 %, für das Stadium II zwischen 72,2 und 84,7 %, bei Stadium III zwischen 44,3 und 83,4 % und bei Stadium IV bei nur noch 8,1 % [132]. Eine Vielzahl von Faktoren wird bei der Prognosestellung berücksichtigt. Sie werden in tumorspezifische, patientenspezifische, therapiespezifische und biologisch-molekulargenetische Prognosefaktoren unterteilt. Dabei werden die makroskopische und mikroskopische Beurteilung des Resektates, das Auftreten von Metastasen, die Beteiligung der regionären Lymphknoten, Begleiterkrankungen, Alter und Geschlecht, Qualität der operativen Versorgung und Nachsorge, Therapieregime und -management sowie die Konzentration des spezifischen Tumormarkers CEA (Carcinoembryonales Antigen) berücksichtigt [145].

Die R0-Resektion ist zur vollständigen Heilung des Patienten unabdingbar. Ein Großteil der Karzinome muss dabei offen chirurgisch entfernt werden. Da bei bis zu zwei Drittel der Patienten Metastasen auftreten, ist eine interdisziplinäre neoadjuvante als auch adjuvante Behandlung unter Einbeziehung von Chemo- und Strahlentherapie von entscheidender Bedeutung für den Therapieerfolg. Doch gerade adjuvante Therapien haben sehr häufig großen negativen Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten. Zum Einsatz kommen Chemotherapeutika wie 5-Fluoruracil (5-FU) in Monotherapie, Oxiplatin, Capecitabin und Irinotecan in Kombination miteinander oder alternativ mit Folsäure oder 5-FU. Auch verschiedene Kombinationen der genannten Therapeutika mit Bevacizumab, dem bisher einzigen zur Behandlung von Tumorerkrankungen zugelassenen VEGF-Antikörper, oder Cetuximab, einem Tyrosinkinase-Inhibitor, kommen bei entsprechendem Rezeptorstatus des Tumors in Frage. Bei irresektablen Fernmetastasen sollte eine kombinierte systemische Chemotherapie zum Einsatz kommen.

Durch die neuen Therapiemöglichkeiten ist seit dem Jahr 2000 die Sterblichkeit beim Kolorektalen Karzinom in Deutschland um 7 % gesunken. Berücksichtigt man die zunehmende Alterung der Bevölkerung sind es sogar 28 % bei Frauen und 22 % bei Männern [57; 63]. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der weiteren Etablierung neuer Therapeutika.

2. Material und Methodik

2.1 Das Tiermodell

2.1.1 Die Versuchstiere

Das Tierexperiment wurde mit insgesamt 100 männlichen syngenetischen WAG/Rij-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere ca. 5 Wochen alt und wiesen ein Körpergewicht von 150-200 g auf.

2.1.2 Die Tierhaltung und Tierpflege

Die Tierhaltung erfolgte entsprechend den Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Das Tierexperiment wurde unter der Bewilligung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, mit der Genehmigungsnummer G0011/09 im Tierversuchslabor der Universitätsklinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen in einem eigens für Kleintiere vorgesehenen, klimatisierten Raum bei einer Luftfeuchtigkeit von 50-60 %, einer Raumtemperatur von 22-24 °C und einem Tag-/Nachtzyklus von je 12 Stunden untergebracht. Die Tiere wurden in Kleingruppen von 4 bis 5 Tieren in Standardlaborkäfigen mit entstaubter Holzgranulateinstreu und Versteckmöglichkeiten aus Pappe gehalten. Trinkwasser und Standardlaborfutter in Pelletform standen *ad libitum* zur Verfügung. An den Operationstagen wurden die Tiere bei freiem Zugang zu Wasser nüchtern belassen und postoperativ bis zum Abend stündlich kontrolliert.

Zwischen der Aufnahme und der ersten Intervention wurde den Tieren eine Akklimatisationsphase von 7 Tagen gewährt. In dieser Zeit konnten sich die Tiere an ihre neue Umgebung und ihre Artgenossen gewöhnen. Die Tiere wurden über den gesamten Studienzeitraum täglich von speziell geschultem Fachpersonal versorgt, gepflegt und bezüglich ihres Allgemeinbefindens begutachtet. Die Futteraufnahme, das Sozialverhalten zu Artgenossen, das Erkundungsverhalten, das Putzverhalten, die Atmung und die Körperhaltung gehörten zu den beobachteten Kriterien. Überdies wurde geprüft, ob die Tiere ihr Fell aufstellten und ob ihre Augen klar und normal geöffnet waren. Außerdem wurden die Operationswunden bzw. -narben makroskopisch begutachtet. Dabei sollte festgestellt werden, ob Wundheilungsstörungen wie Wundschwellung, Wundsekretion, Nahtdehiszenz oder Narbenbruch vorlagen. Nach acht Wochen wurden die Tiere durch eine Kohlendioxid-Narkoseüberdosierung getötet und geblindet durch zwei Untersucher obduziert.

2.2 Die Zelllinie

Die verwendeten syngenetischen Kolonadenokarzinomzellen CC-531 (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) der WAG/Rij-Ratte wurden in RPMI 1640 Medium (Biochrom, Deutschland) 1:1 mit 10 %igem inaktivierten fetalen Rinderserum (Gibco BRL, Deutschland), 2 mmol/l Glutamin (Biochrom, Deutschland) und 1000 IU/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco, Deutschland) kultiviert.

Zur Herstellung der gewünschten Tumorzellkonzentration (10^5 CC-531-Zellen/ml) erfolgten nach Absaugen des Mediums und Spülung mit PBS (Sigma-Aldrich, Deutschland) die Zugabe von 4 ml Trypsin-/ EDTA-Lösung (Gibco, Deutschland) und eine 5-minütige Inkubation bei 37 °C. Dies erfolgte in angefeuchteter Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 %. Nach der anschließenden Neutralisation des Trypsins durch Zugabe von 10 ml Vollmedium und gründlicher Vermischung wurde die Zellsuspension für 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit weiteren 10 ml frischem Vollmedium versetzt und resuspendiert. Dies erfolgte ohne Zusatz von fetalem Rinderserum, um Reaktionen mit Fremdartigenen zu vermeiden. Die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wurde nach der Trypan-Blau-Methode durchgeführt, wobei 0,1 µl einer Lösung, die zu gleichen Teilen aus Trypan-Blau und Zellsuspension bestand, in die Zählkammer gegeben wurde. Gleichzeitig ermöglichte diese Methode eine Einschätzung der Rate an avitalen Zellen. Avitale Zellen färben sich blau, vitale Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und bleiben farblos. Entsprechend der Zellzahl erfolgte die Verdünnung der Suspension mit Fertigmedium auf 10^5 Zellen/ml. Von der fertigen Zellsuspension wurde jeweils 1 ml in Mikroreaktionsgefäße portioniert. Die Gefäße blieben bis zur abschließenden Verwendung im Inkubator bei 5 % CO₂ und 37 °C und wurden unmittelbar vor der Applikation gut geschwenkt, um abgesunkene Tumorzellen zu resuspendieren.

2.3 Das Studiendesign

2.3.1 Übersicht

Sieben Tage nach der Aufnahme der Tiere erfolgte die erste Intervention. Die Tiere wurden gekennzeichnet, in Gruppen randomisiert und es erfolgte die Tumorzellapplikation nach Laparotomie. Nach 28 Tagen wurden einem Teil der Tiere Ports als Möglichkeit eines venösen Zugangs implantiert. Es erfolgte zugleich die erste Behandlung bei allen Tieren. Die Behandlung wurde in einem Zwölfstunderrhythmus über sieben Tage fortgesetzt. Einen Tag nach der letzten Behandlung wurden die intravenösen Ports entfernt. Weitere 21 Tage nach der Beendigung der Behandlung, bzw. 28 Tage nach der Tumorzellapplikation wurden die Tiere durch CO₂-Inhalation getötet und das gesamte intraperitoneale und subkutane Tumorgewicht bestimmt. Zu den Zeitpunkten 2, 6, 7 und 10 Wochen wurde das Körpergewicht der Tiere ermittelt, um die Wachstumsentwicklung verfolgen zu können.

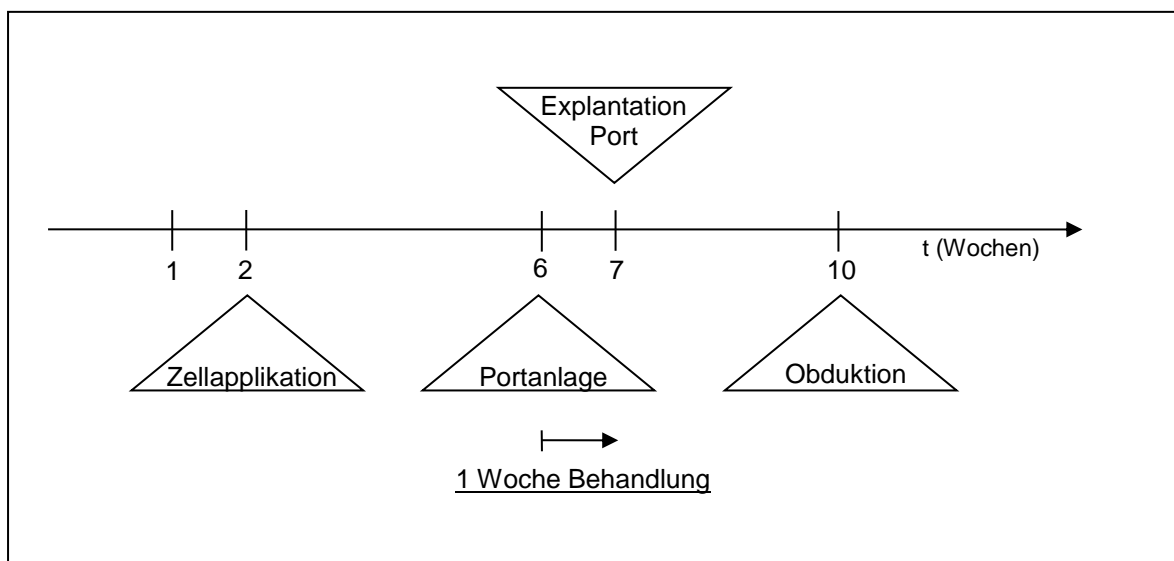


Abb. 4: Studiendesign schematisch (t = Zeit in Wochen)

2.3.2 Die Randomisierung

Für die Untersuchung des Einflusses von BTB 14431 und Emodin auf das Wachstum von fortgeschrittenen Tumoren des Kolonadenokarzinomtyps wurden beide Substanzen in je zwei verschiedenen Konzentrationen verabreicht. Des Weiteren wurden in dem Tierexperiment die beiden Applikationsformen intravenös und intraperitoneal gegenübergestellt. Die jeweilige Kontrollgruppe erhielt Ringer-Lactat-Lösung. So ergaben sich zehn Therapiegruppen mit je zehn Tieren.

	BTB 14431 0,3 mg/kg KG	BTB 14431 1,7 mg/kg KG	Emodin 2,5 mg/kg KG	Emodin 5 mg/kg KG	Ringer- Laktat
Intermittierende intravenöse Therapie	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV	Gruppe V
Intermittierende intraperitoneale Therapie	Gruppe VI	Gruppe VII	Gruppe VIII	Gruppe IX	Gruppe X

Tab. 3: Randomisierung der Tiere in die jeweiligen Therapiegruppen

2.3.3 Die Tumorimplantation und die Operationsmethodik

Mediane Laparotomie

Nachdem jedes Tier gewogen (Waage: Sartorius BL 12, Sartorius, Deutschland), gekennzeichnet und randomisiert wurde, erfolgte die Narkose per intramuskulärer Injektion einer körperrgewichtskorrelierten Kombination von 12 mg/kg KG Xylazin (Rompun[®], Bayer-AG) und 75 mg/kg KG Ketamin (Ketanest[®], Pfizer). Das Operationsfeld wurde vom Rippenbogen bis zum knöchernen Becken gewaschen und enthaart (Einmalrasierer, Wilkinson Sword, Deutschland). Danach wurden die Tiere auf einer abgedeckten Heizmatte (THERMOMASTER, Deutschland) auf dem Rücken gelagert und das Operationsfeld desinfiziert (Braunol[®], Braun, Deutschland). Nach dem sterilen Abdecken (Raucodrape, Lohmann & Rauscher, Österreich) des übrigen Körpers erfolgte eine ca. 4 cm lange mediane Inzision der Haut und Eröffnung der Bauchhöhle in der *Linea alba*. Der Darm wurde zur Simulation der Operationsbedingungen bei Tumorresektion eventeriert und zur Antrocknung der intestinalen Serosa auf einer sterilen Kompresse gelagert. Nach einer Wartezeit von 5 min wurde der Darm reponiert und die intraperitoneale Tumorzeldosis (1 ml mit 10⁵ syngenetischen CC-531 Zellen) instilliert. Danach erfolgte ein einschichtiger

Verschluss der Bauchdecke durch eine fortlaufende Naht mit einem Vicrylfaden (Vicryl[®], Ethicon, Deutschland) der Stärke 4/0, sowie eine fortlaufende Matratzennaht der Haut mit der gleichen Fadensorte. Bei der Hautnaht wurden die Knoten versenkt, damit die Tiere die Naht im Rahmen der Fellpflege nicht gefährdeten. Um Wundinfektionen zu vermeiden, wurde das Operationsfeld anschließend erneut mit Jodlösung desinfiziert und mit einem Sprühverband abgedeckt. Danach erfolgte in Bauchlage die Injektion der Tumorzellsuspension (1 ml mit 10⁵ syngenetischen CC-531 Zellen) subkutan am Nacken. Die postoperative Analgesie erfolgte mit subkutaner Injektion von 4 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer).

Die Portimplantation

An Tag 28 postoperativ bzw. Tag 1 der Behandlung erhielten die Tiere der Gruppen I bis V für die Dauer von sieben Tagen ein Portkathetersystem (ROP-3.5H, Norfolk-Access Technologies, USA) in die rechte *Vena jugularis externa* implantiert, um eine intravenöse Therapie zu gewährleisten. Hierzu wurden die Tiere wie oben beschrieben vorbereitet, narkotisiert, gelagert, desinfiziert und abgedeckt, wobei das Operationsfeld hierbei rechtsseitig am Hals-/Schulterbereich lag. Folgend wurde ein ca. 1 cm langer Hautschnitt über dem *Musculus sternocleidomastoideus* rechts durchgeführt. Nach stumpfer subkutaner Präparation einer Hauttasche für den Port an der lateralen Halsseite wurde die *Vena jugularis* aufgesucht und dargestellt. Nach lockerem Anlegen zweier Ligaturen aus Vicrylfaden der Stärke 4/0 um den proximalen und distalen Abschnitt der Vene, wurde sie quer zum Verlauf eröffnet. Das Lumen wurde mit einem Introducer aufgesucht und durch dessen Einführung nach proximal geweitet. Anschließend wurde nun der Portkatheter vorsichtig ca. 1 cm nach proximal vorgeschoben, während der Introducer langsam zurückgezogen wurde. Der Katheter wurde dann durch Befestigung der vorgelegten proximalen und distalen Ligatur fixiert und die Portkammer in die vorbereitete Hauttasche geschoben. Nach Prüfung der korrekten Lage und Durchlässigkeit des Katheters erfolgte die erste Applikation der Therapielösung. Im Folgenden wurde der Hautverschluss mittels Vicryl 4/0 und fortlaufender Naht durchgeführt. Die postoperative Versorgung erfolgte analog zur medianen Laparotomie.

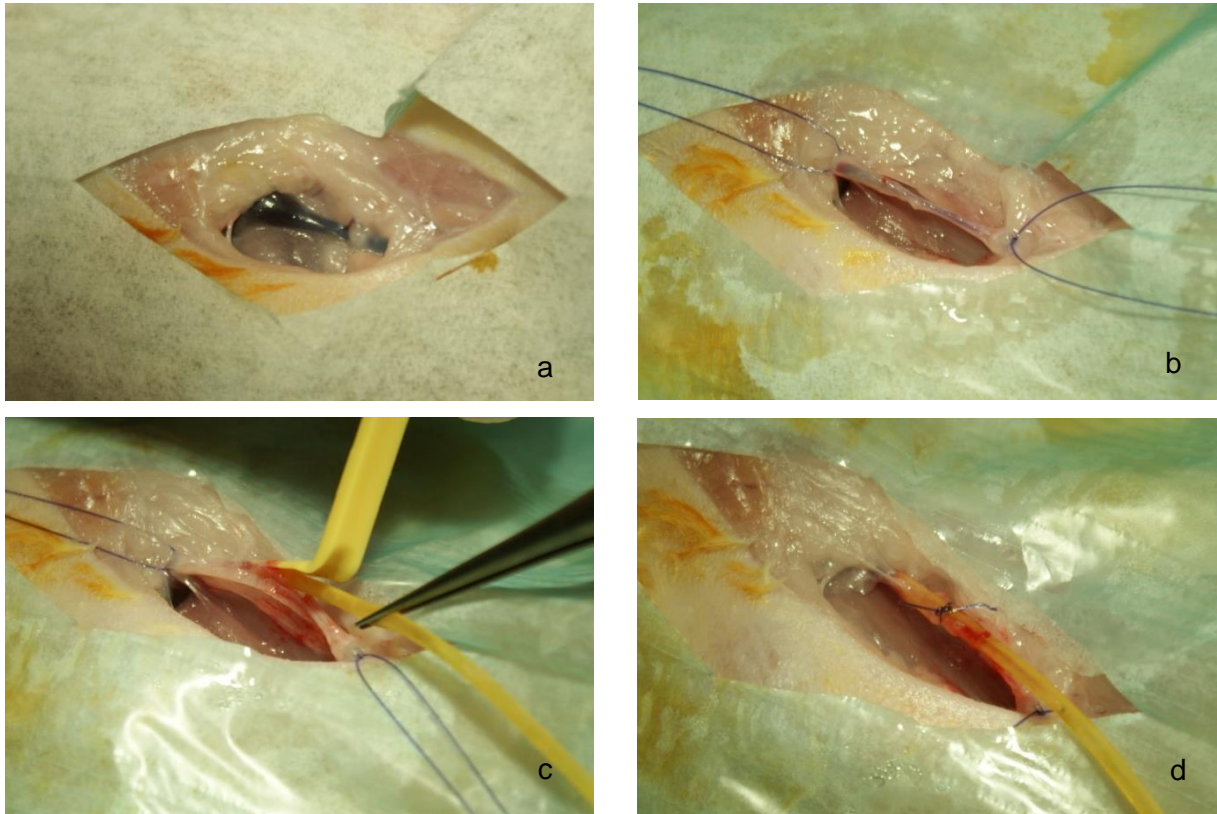


Abb. 5: Die Portimplantation

Bild a: Darstellen der *V. jugularis externa*. Bild b: Fixation der *V. jugularis externa*.

Bild c: Einführen des Katheters mit Hilfe des Introducers. Bild d: Ligierter Portkatheter

Die Portexplantation

Das Entfernen der Katheter bei den Tieren der Gruppen I bis V erfolgte einen Tag nach der letzten intravenösen Therapie. Hierzu wurden die Tiere wie oben beschrieben vorbereitet, narkotisiert, gelagert, desinfiziert und abgedeckt. Die vorhandene Narbe wurde wieder eröffnet und das Operationsfeld unter Schonung des Katheters erweitert. Nach Entfernung der postoperativ reaktiv gebildeten fibrösen Kapsel und Darstellung des Ports erfolgte die Mobilisierung und Entfernung des Katheters. Es erfolgte eine Ligatur der Vene. Abschließend wurde die gebildete Kapsel soweit wie möglich entfernt, die Porttasche zur Vermeidung von Infektionen mit verdünnter Braunol®-Lösung gespült und ein Debridement der Wundränder vorgenommen. Danach erfolgte der Wundverschluss durch eine fortlaufende Hautnaht mit einem Vicrylfaden der Stärke 4/0. Die postoperative Versorgung erfolgte analog zur medianen Laparotomie.

2.4 Die Herstellung der Lösungen von Emodin und BTB 14431

Die verschiedenen Konzentrationen von Emodin und BTB 14431 wurden als Lösung direkt vor dem Experiment aus den Reinsubstanzen steril hergestellt. Als Lösungsmittel wurde eine 5 %ige Polyvinylpyrrolidonlösung (im Folgenden als PVP bezeichnet) aus Polyvinylpyrrolidon (PVP, Sigma-Aldrich, Deutschland) und 0,9 %iger Natriumchloridlösung (Braun, Deutschland) hergestellt. Das pulverförmige Emodin (ACROS Organics, Geel, Belgien) und BTB 14431 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurden konzentrationsabhängig abgewogen und in 5 %igem PVP gelöst und anschließend in einem Rüttler (MS1 Minishaker, IKA®-Werke, Deutschland) kurz bei 2000 U/min vermischt. Nach Fertigstellung der Suspensionen wurden diese für 20 min in ein auf 40 °C vorgeheiztes Ultraschallbad (Sonorex, BANDELIN electronic, Deutschland) gestellt und zusätzlich alle 5 min geschwenkt, um eine bestmögliche Lösung der Testsubstanzen zu erreichen.

Für die Kontrollgruppen wurde handelsübliche Ringer-Lactat-Lösung (Braun, Deutschland) verwendet.

2.5 Die Behandlung

Jedem Tier wurde das gleiche Volumen von 1 ml pro Behandlung intravenös bzw. intraperitoneal appliziert. Die Applikationen erfolgten zweimal täglich intermittierend im Abstand von zwölf Stunden sieben Tage lang, sodass insgesamt vierzehn Injektionen vorgenommen wurden. Vor jeder Manipulation wurde der Allgemeinzustand des Tieres geprüft. Im Anschluss an die letzte Applikation wurde das Gewicht bei allen Tieren bestimmt. Gemäß der Randomisierung wurde bei einem Teil der Tiere die intravenöse systemische Therapie unter ca. 2 min andauernder Isoflurannarkose durchgeführt. Diese Immobilisation der Tiere ermöglichte es, die Therapielösung korrekt über den Port zu injizieren. Um Lösungsrückstände im Port zu vermeiden, wurde dieser anschließend mit 0,2 ml 0,9 %iger Natriumchloridlösung gespült.

Für die Gabe der lokalen intraperitonealen Therapie erhielten die dafür randomisierten Tiere eine zügige Injektion im Bereich des dritten oder vierten abdominalen Quadranten unter Schonung des Darmkonvolutes.

2.6 Die Obduktion und die Bestimmung des Tumorgewichts

Am 56. postoperativen Tag bzw. 21 Tage nach dem Ende der Behandlung wurden die Tiere mittels Kohlendioxid euthanasiert, durch zwei Untersucher geblindet und unabhängig voneinander untersucht sowie die Körper- und Tumorgewichte bestimmt. Später wurden die

erhobenen Daten der Tiergruppe zugeordnet.

Das Tumorgewicht wurde durch die subtile Präparation der Tumormasse ermittelt. Zur Beurteilung des Wachstums der im Bereich der Nackenfalte applizierten Tumorzellen, wurde ein medianer Hautschnitt vom *Os occipitale* bis zum Schulterbereich angelegt. Vorhandenes Tumorgewebe wurde entnommen, von Bindegewebe befreit und dann gewogen (BP 310S, Sartorius, Deutschland). Zur Beurteilung des Wachstums der im Bauchraum applizierten Tumorzellen, wurde die Bauchhöhle paramedian vom *Processus xiphoideus* bis zur Höhe der *Spina iliaca ventralis cranialis* eröffnet. Die paramediane Schnitfführung ermöglichte eine Untersuchung der *Linea alba* auf Inzisionsmetastasen. Die Inspektion der Bauchhöhle erfolgte standardisiert, beginnend mit dem Peritoneum, gefolgt vom kleinen Becken und wurde dann systematisch bis zum Zwerchfell fortgesetzt. Gefundenes Tumorgewebe wurde nach sorgfältiger Präparation entfernt, analog zum Nackenbereich von restlichem Bindegewebe befreit, gesammelt und das Gesamtgewicht erfasst. Nach der Exploration des Bauchraums wurde der Schnitt nach kranial erweitert, um evtl. vorhandene intrathorakale Metastasierung zu erkennen.

2.7 Die Dokumentation und die statistische Auswertung

Für jedes Tier wurde auf standardisierten Bögen die Tiernummer, die Therapiegruppe, Zeitpunkt der Aufnahme, Zeitpunkt und Art aller Eingriffe, das Körpergewicht zu verschiedenen Zeitpunkten und die Ergebnisse der Obduktion erfasst. Außerdem war auf beiden Bögen Platz zur Dokumentation von Besonderheiten.

Die Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS 18.0 (SPSS Inc., USA). Aufgrund der tierexperimentell bedingten niedrigen Fallzahl wurde keine Normalverteilung angenommen. Daher wurden die Daten mit nichtparametrischen Tests analysiert. Zunächst wurden die Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test für k unabhängige Stichproben auf Unterschiede geprüft. Die folgenden Einzelvergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Das Signifikanzlevel wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Die Grafiken wurden mittels Box-Whisker-Plots dargestellt. Diese bilden neben dem Median die untere und obere Quartile (box) sowie 1,5 Interquartildifferenzen (whisker) ab. Ausreißer werden als kleine Sternchen in den jeweiligen Abbildungen dargestellt. Die Daten im Text wurden als Median und 90 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes angegeben.

Die Box-Whisker-Plots weisen entsprechend der unterschiedlichen Verteilungslast unterschiedliche Ordinatenkalierungen auf.

Die Begriffe Behandlung und Therapie wurden in dieser Arbeit inhaltlich gleichgesetzt. Das Gewicht intrathorakaler Tumore wurde im Folgenden zum Gewicht der abdominalen Tumore gezählt.

3. Ergebnisse

Das Tierexperiment wurde mit n=100 Ratten durchgeführt. Ein Tier starb während der Portimplantation, zwei Tiere starben während der Verabreichung der intravenösen Therapie und fünf Tiere starben im Versuchsverlauf unabhängig von therapeutischen Maßnahmen. Somit lagen der statistischen Auswertung die Werte von n=92 Tieren zu Grunde. Die Todesursachen und -zeitpunkte sind detailliert in Tab. 4 zu finden.

Gruppe	Td1	Td2	Td3	Td4	Td5	Td6	Td7	Portim-plantation	Gesamt	Anzahl Tiere
IV (Emodin 5 mg/kg iv)		1		1		1			3	n = 7
V (Kontrolle iv)								1	1	n = 9
VI (BTB 14431 0,3 mg/kg ip)				1			1		2	n = 8
VII (BTB 14431 1,7 mg/kg ip)					1				1	n = 9
VIII (Emodin 2,5 mg/kg ip)					1				1	n = 9

Tab. 4: Außerordentliche Todesfälle; Td1- Td7: Therapietag 1 - 7; Portimplantation am Therapietag 1; iv = intravenös, ip = intraperitoneal
Todesursachen: Gruppe IV: ein Tier starb während der Injektion an Therapietag 6: Herz-Kreislaufversagen, zwei Tiere wurden tot im Käfig aufgefunden; Gruppe V: ein Tier starb während der Portimplantation an Herz-Kreislaufversagen; Gruppe VI, Gruppe VII, Gruppe VIII: diese Tiere wurden tot im Käfig aufgefunden.

3.1 Nebenwirkungen

Vereinzelt fiel während der intravenösen Applikation der hohen Konzentrationen von BTB 14431 und Emodin eine temporäre Abnahme der Atemfrequenz und Atemtiefe im Rahmen der Isoflurannarkose auf. Ein Tier der Gruppe IV (Emodin 5 mg/kg KG) verstarben während der Durchführung der intravenösen Behandlung (siehe Tab. 4). Des Weiteren wurden vereinzelt Abszesse am Portreservoir, bzw. um die Einstichstelle in den Port beobachtet.

Bei den intraperitonealen Applikationen wurden im Gegensatz zu den intravenösen Injektionen keine Auffälligkeiten bezüglich Atmung und Kreislauf der Tiere beobachtet.

3.2 Intravenöse Applikation von Emodin und BTB 14431

3.2.1 Die Tumorgewichte

Das Gesamtumorgewicht - Summe aus subkutanen und abdominalen Tumoren

iv Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg 6,8 g (5,3 - 8,2 g)	BTB 14431 1,7 mg/kg 18,2 g (16,0 - 20,8 g)	Emodin 2,5 mg/kg 9,4 g (7,9 - 10,7 g)	Emodin 5 mg/kg 8,3 g (7,6 - 9,3 g)
Kontrolle 15,9 g (14,5 - 20 g)	$p \leq 0,01$	$p = 0,497$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$

Tab. 5: Vergleich des Gesamtumorgewichts (g) der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.

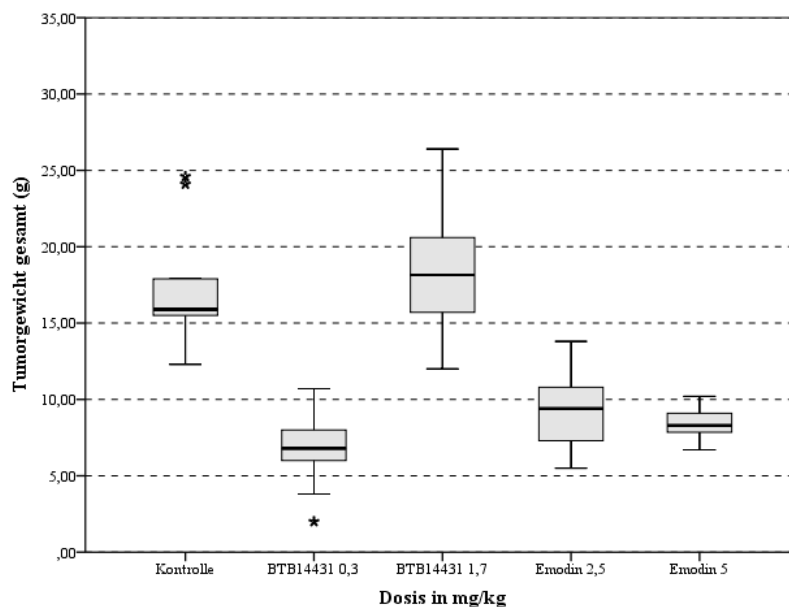


Abb. 6: Das Gesamtumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intravenöser Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.

Das Gesamtumorgewicht unterschied sich sowohl in Gruppe I (BTB 14431 0,3 mg/kg KG) als auch in beiden Gruppen mit Emodinbehandlung (Gruppe III und IV) von dem der Kontrolltiere. Die intravenöse Therapie mit 0,3 mg/kg KG BTB 14431 (Gruppe I), 2,5 mg/kg KG Emodin (Gruppe III) und 5 mg/kg KG Emodin (Gruppe IV) bewirkte eine Reduktion des Gesamtumorgewachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei Gruppe II (BTB 14431 1,7 mg/kg KG) fiel eine tendenzielle Zunahme des Gesamtumorgewichts im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

Die Daten aller Gruppen sind in Tab. 5 gegenübergestellt.

Das abdominale Tumorgewicht

iv Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg 4,5 g (3,3 - 5,4 g)	BTB 14431 1,7 mg/kg 14,1 g (12,7 - 16,8 g)	Emodin 2,5 mg/kg 7,4 g (6,3 - 8,3 g)	Emodin 5 mg/kg 6,4 g (5,5 - 7,1 g)
Kontrolle 13,5 g (11,1 - 15,8 g)	p ≤ 0,01	p = 0,447	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01

Tab. 6: Vergleich des abdominalen Tumorgewichts der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.

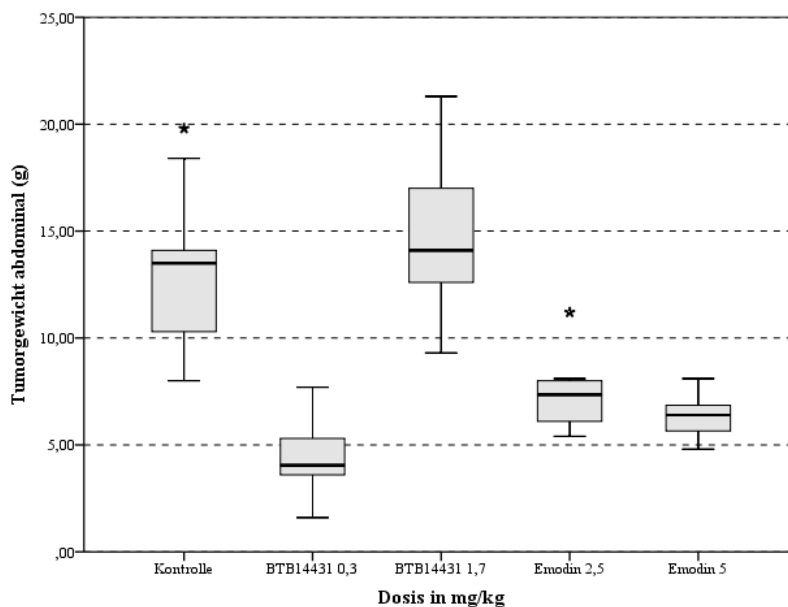


Abb. 7: Das abdominale Tumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intravenöser Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.

Die abdominalen Tumorgewichte zeigten die gleiche Verteilung wie die Gesamttumorgewichte. Die Therapien mit 0,3 mg/kg KG BTB 14431 (Gruppe I) und Emodin in beiden Konzentrationen (Gruppe III und IV) zeigten eine Reduktion des abdominalen Tumorgewichts im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Tiere der Gruppe II (BTB 14431 1,7 mg/kg KG) zeigten tendenziell höhere abdominale Tumorgewichte als die Tiere der Kontrollgruppe.

Die Daten sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Das subkutane Tumorgewicht

iv Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg 2,5 g (1,7 - 3,1 g)	BTB 14431 1,7 mg/kg 3,7 g (3,2 - 4,1 g)	Emodin 2,5 mg/kg 2,2 g (1,4 - 2,6 g)	Emodin 5 mg/kg 2,2 g (1,5 - 2,7 g)
Kontrolle 4,2 g (3 - 4,7 g)	p = 0,035	p = 0,604	p ≤ 0,01	p = 0,023

Tab. 7: Vergleich des subkutanen Tumorgewichts der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.

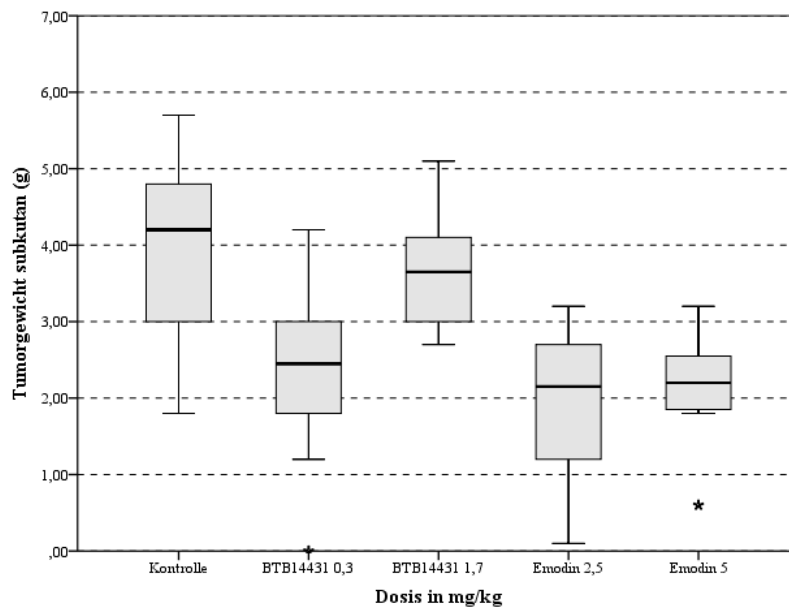


Abb. 8: Das subkutane Tumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intravenöser Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.

Das subkutane Tumorgewicht war in allen intravenösen Therapiegruppen niedriger als in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war in den Gruppen I (BTB 14431 0,3 mg/kg KG), III (Emodin 2,5 mg/kg KG) und IV (Emodin 5 mg/kg KG) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant. Bei Gruppe II (BTB 14431 1,7 mg/kg KG) war dies nicht der Fall. Hier war das subkutane Tumorgewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe nur geringfügig niedriger.

Die Gegenüberstellung der Daten ist in Tab. 7 dargestellt.

3.2.2 Die Änderungen des Körpergewichts der Tiere

Gewichtsveränderungen lassen Rückschlüsse auf das Fress- und Trinkverhalten und somit das Wohlbefinden der Tiere zu. Um den systemischen Einfluss der unterschiedlichen Substanzen und deren Konzentrationen auf die Tiere zu untersuchen, wurden die Veränderungen des Körpergewichts der Tiere zwischen verschiedenen Zeiträumen ausgewertet. Dabei wurde mit prozentualen Gewichtsunterschieden gearbeitet, um Fehler durch unterschiedliche Initialgewichte zu verringern.

Da die Tumorgewichte erst am Versuchsende bestimmt werden konnten, wurden diese nicht vom Tiergewicht abgezogen.

Die Änderung des Körpergewichts zwischen Therapiebeginn und Obduktion

iv Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg -1,8 % (-2,4 - -0,8 %)	BTB 14431 1,7 mg/kg -0,4 % (-1,3 - 1,4 %)	Emodin 2,5 mg/kg 0,2 % (-2,3 - 1,7 %)	Emodin 5 mg/kg -0,4 % (-4,1 - 2,2 %)
Kontrolle -1,9 % (-2,7 - -1,2 %)	p = 0,549	p = 0,053	p = 0,211	p = 0,470

Tab. 8: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen zwischen Therapiebeginn und Obduktion mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.

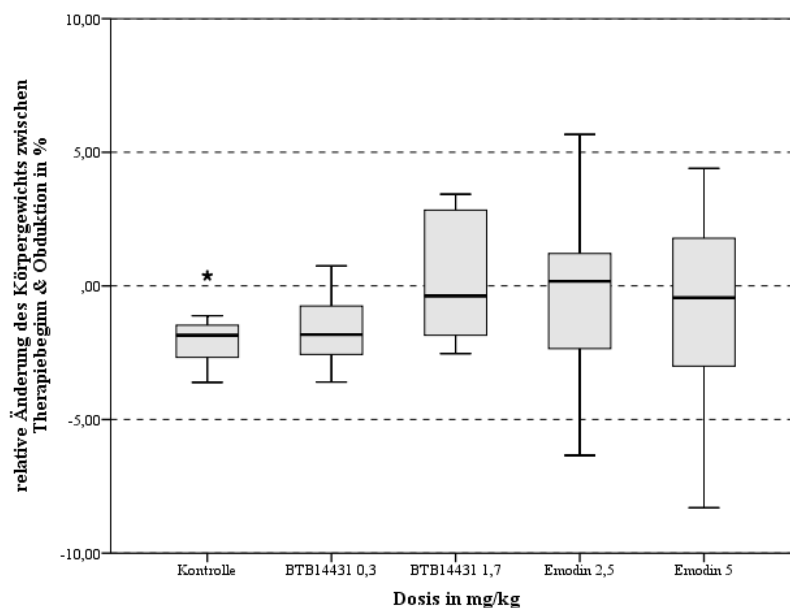


Abb. 9: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapiebeginn und Obduktion.

In den Gruppen II (BTB 14431 1,7 mg/kg KG), III (Emodin 2,5 mg/kg KG) und IV (Emodin 5 mg/kg KG) fiel auf, dass sich das Körpergewicht der Tiere, bei teils starker individueller Streuung nahezu nicht veränderte. Die Tiere der Kontrollgruppe und der Gruppe I (BTB 14431 0,3 mg/kg KG) verloren tendenziell an Körpergewicht. Dies variierte nicht zwischen der Kontrollgruppe und den Therapiegruppen.

Die Änderung des Körpergewichts im Therapiezeitraum

iv Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg -5,7 % (-9,7 - -2,2 %)	BTB 14431 1,7 mg/kg -3,1 % (-4,2 - -2,6 %)	Emodin 2,5 mg/kg -5,1 % (-6,5 - -4,4 %)	Emodin 5 mg/kg -4,9 % (-7,5 - -3,2 %)
Kontrolle -5,2 % (-5,8 - -3,0 %)	p = 0,604	p = 0,053	p = 0,780	p = 0,837

Tab. 9: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen im Therapiezeitraum mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.

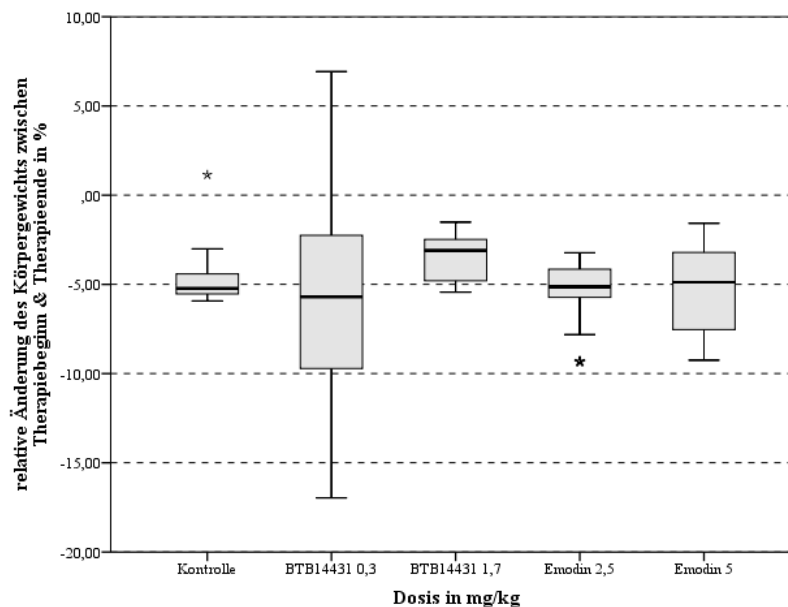


Abb. 10: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapiebeginn und Therapieende.

Um die Wachstumshemmung der Tiere durch die Therapie bewerten zu können, wurde die prozentuale Gewichtsentwicklung zwischen Portimplantation und Therapieende bzw. Portexplantation beobachtet. Auffallend war, dass alle Tiere an Körpergewicht verloren, auch die Tiere der Kontrollgruppe. Dabei zeigten die Werte der Gruppe I (BTB 14431 0,3 mg/kg

KG) die größte Streubreite. Die Obergrenze des 90%-Konfidenzintervalls lag bei dieser Gruppe sogar im positiven Bereich. Einzelne Tiere dieser Gruppe bildeten somit eine Ausnahme, da ihr Körpergewicht anstieg. Die Werte der Therapiegruppen unterschieden sich nicht von denen der Kontrollgruppe.

Die Änderung des Körpergewichts im Anschluss an die Therapie

iv Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg 4,1 % (1,2 - 8,7 %)	BTB 14431 1,7 mg/kg 3,1 % (2,8 - 4,3 %)	Emodin 2,5 mg/kg 5,0 % (4,1 - 6,8 %)	Emodin 5 mg/kg 3,7 % (2,2 - 7,0 %)
Kontrolle 3,1 % (1,6 - 3,5 %)	p = 0,400	p = 0,356	p ≤ 0,01	p = 0,299

Tab. 10: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen im Anschluss an die Therapie mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.

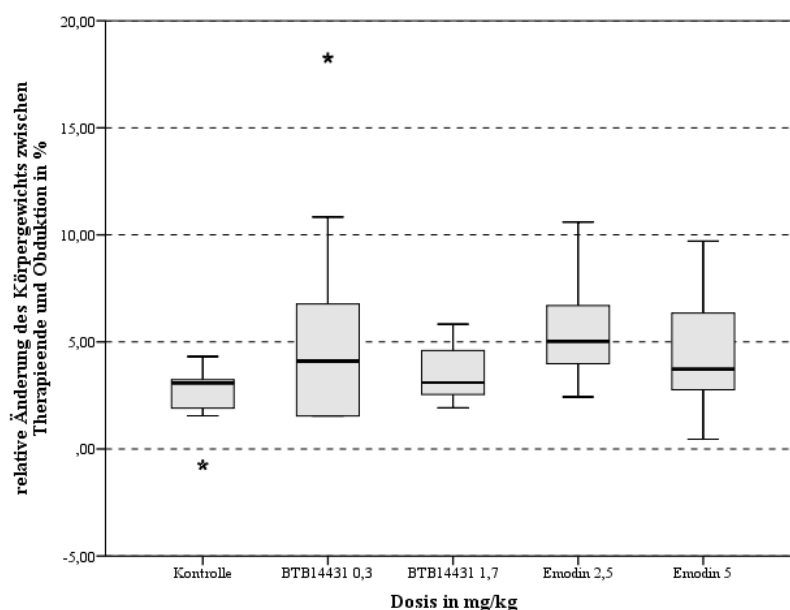


Abb. 11: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapieende und Obduktion.

In der Zeit nach dem Therapieintervall stieg das Körpergewicht der Tiere an, was zu einer vollständigen Wiedererlangung der zu Therapiebeginn bestimmten Körpergewichte bis zum Zeitpunkt der Obduktion führte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergaben sich sowohl für die Gruppen I (BTB 14431 0,3 mg/kg KG) und II (BTB 14431 1,7 mg/kg KG) als auch für Gruppe IV (Emodin 5 mg/kg KG) keine Differenzen. Lediglich bei den Tieren der Gruppe III (Emodin 2,5 mg/kg KG) stieg das Körpergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker an.

3.3 Intraperitoneale Applikation von Emodin und BTB 14431

3.3.1 Die Tumorgewichte

Das Gesamtumorgewicht – Summe aus subkutanen und abdominalen Tumoren

ip Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg 13,3 g (10,4 - 17,6 g)	BTB 14431 1,7 mg/kg 14,3 g (11,5 - 19,3 g)	Emodin 2,5 mg/kg 15,8 g (12,7 - 18,1 g)	Emodin 5 mg/kg 11,1 g (10,1 - 13,8 g)
Kontrolle 19,8 g (15,4 - 23,3 g)	p = 0,101	p = 0,243	p = 0,243	p ≤ 0,01

Tab. 11: Vergleich des Gesamtumorgewichts der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die exakte Signifikanz.

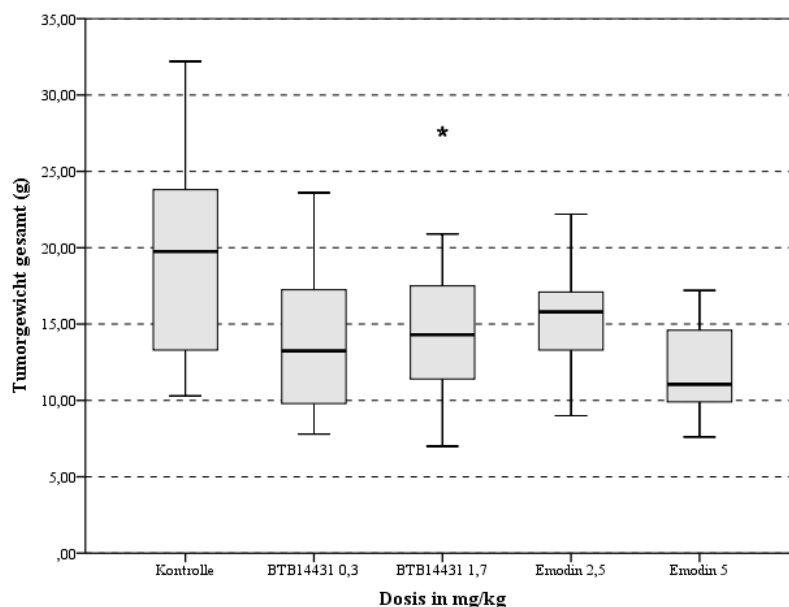


Abb. 12: Das Gesamtumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intraperitonealer Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.

In den Gruppen VI (BTB 14431 0,3 mg/kg KG), VII (BTB 14431 1,7 mg/kg KG) und VIII (Emodin 2,5 mg/kg KG) konnte zwar eine Verringerung des Gesamtumorgewichts festgestellt werden, diese war jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Bei Gruppe IX (Emodin 5 mg/kg KG) fiel eine Verringerung des Tumorgewichts auf.

Das abdominale Tumorgewicht

ip Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg 9,0 g (7,4 - 13,1 g)	BTB 14431 1,7 mg/kg 11,8 g (8,4 - 15,2 g)	Emodin 2,5 mg/kg 11,3 g (8,8 - 13,8 g)	Emodin 5 mg/kg 8,6 g (6 - 10,4 g)
Kontrolle 15,5 g (12,1 - 19,5 g)	p = 0,055	p = 0,156	p = 0,079	p ≤ 0,01

Tab. 12: Vergleich des intraperitonealen Tumorgewichts der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.

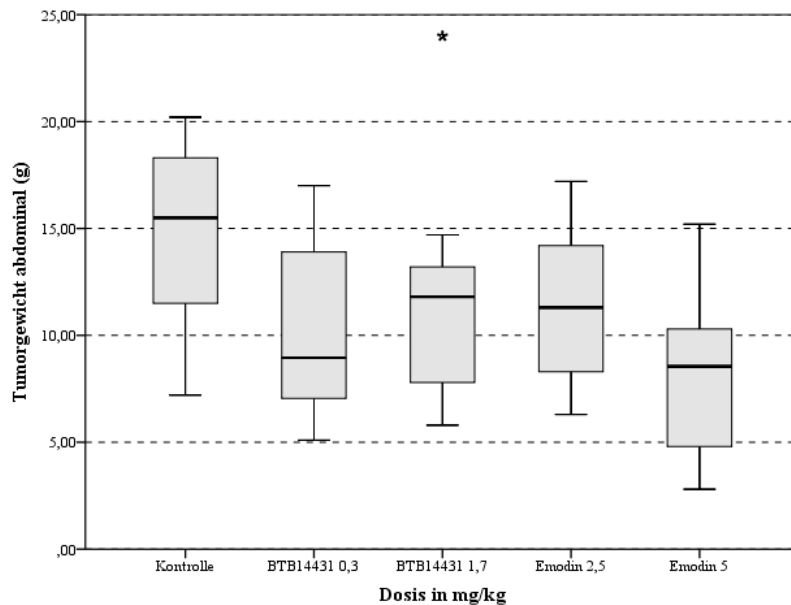


Abb. 13: Das abdominale Tumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intraperitonealer Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.

Ebenso wie die Tiere der iv-Therapie, zeigten auch die Tiere der ip-Therapie eine nahezu gleiche Verteilung bei den abdominalen Tumorgewichten und den Gesamttumorgewichten. Die Therapie mit 5 mg/kg KG Emodin (Gruppe IX) führte zu einer Verringerung der abdominalen Tumorgewichte.

Diese Werte wurden in Tab. 12 zusammengefasst.

Das subkutane Tumorgewicht

ip Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg 4,1 g (2,7 - 4,8 g)	BTB 14431 1,7 mg/kg 3,6 g (2,5 - 4,7 g)	Emodin 2,5 mg/kg 4,1 g (3,2 - 5 g)	Emodin 5 mg/kg 3,5 g (2,8 - 4,7 g)
Kontrolle 4,0 g (2,6 - 4,5 g)	p = 0,829	p = 1,000	p = 0,447	p = 0,971

Tab. 13: Vergleich des subkutanen Tumorgewichts der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.

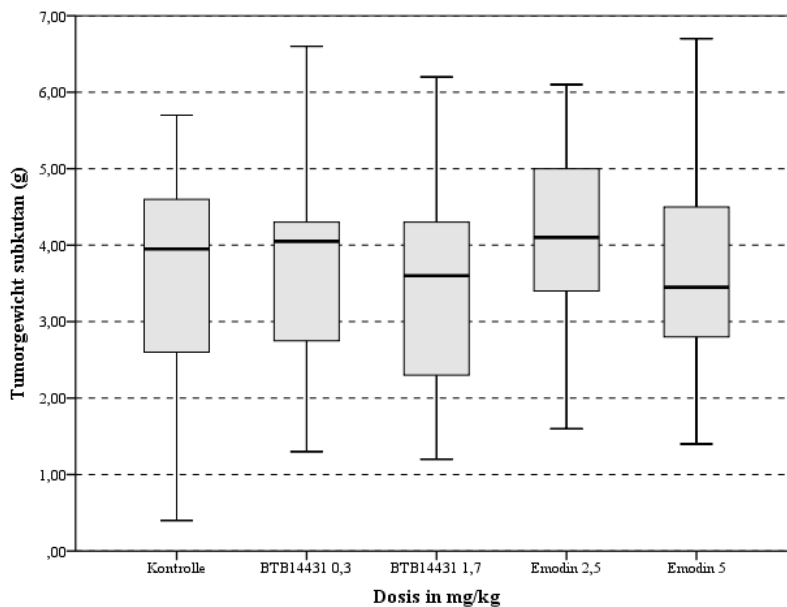


Abb. 14: Das subkutane Tumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intraperitonealer Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.

Im Direktvergleich mittels Mann-Whitney-U-Test fand sich kein Unterschied des subkutanen Tumorgewichts bei den Therapiegruppen gegenüber der Behandlung mit Ringer-Lactat. Die Werte zu diesen Berechnungen sind in Tab. 13 zu finden.

3.3.2 Die Änderungen des Körpergewichts der Tiere

Die Änderung des Körpergewichts zwischen Therapiebeginn und Obduktion

ip Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg 1,0 % (0,2 - 2,6 %)	BTB 14431 1,7 mg/kg 0,8 % (0,6 - 7,6 %)	Emodin 2,5 mg/kg 1,1 % (0,3 - 3,0 %)	Emodin 5 mg/kg 2,7 % (0,5 - 3,3 %)
Kontrolle -0,2 % (-1,7 - 0,2 %)	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p = 0,013$	$p = 0,019$

Tab. 14: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen zwischen Therapiebeginn und Obduktion mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.

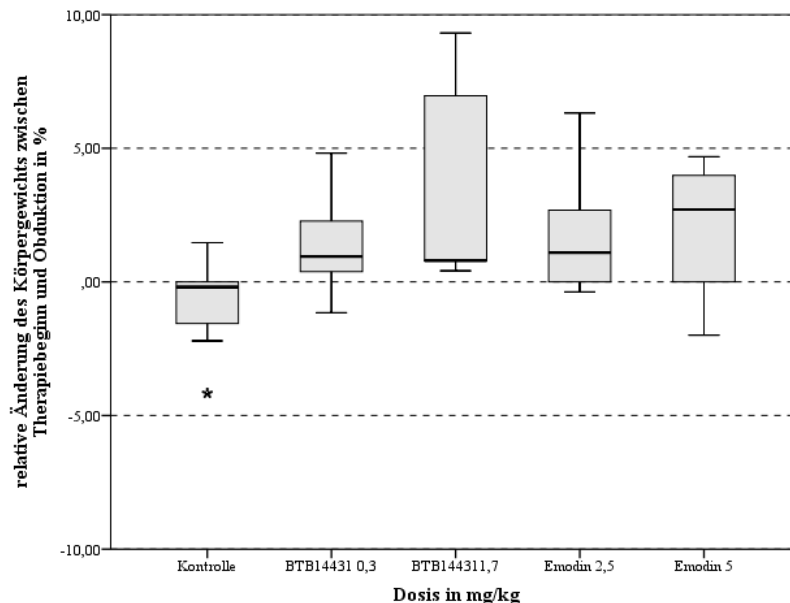


Abb. 15: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapiebeginn und Obduktion.

Das Körpergewicht der Tiere aller Therapiegruppen stieg zwischen Therapiebeginn und Obduktion an. Bei der Kontrollgruppe zeigte sich eine geringfügige Verringerung des Körpergewichts. Die Gewichtsentwicklung der Therapiegruppen unterschied sich von der Kontrollgruppe.

Die Änderung des Körpergewichts im Therapiezeitraum

ip Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg 0,2 % (-0,4 - 1,0 %)	BTB 14431 1,7 mg/kg 0,0 % (-0,5 - 0,5 %)	Emodin 2,5 mg/kg 0,4 % (0,1 - 1,1 %)	Emodin 5 mg/kg 1,0 % (-0,7 - 1,6 %)
Kontrolle -0,6 % (-0,8 - 0,1 %)	p = 0,173	p = 0,243	p = 0,035	p = 0,247

Tab. 15: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen im Therapiezeitraum mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.

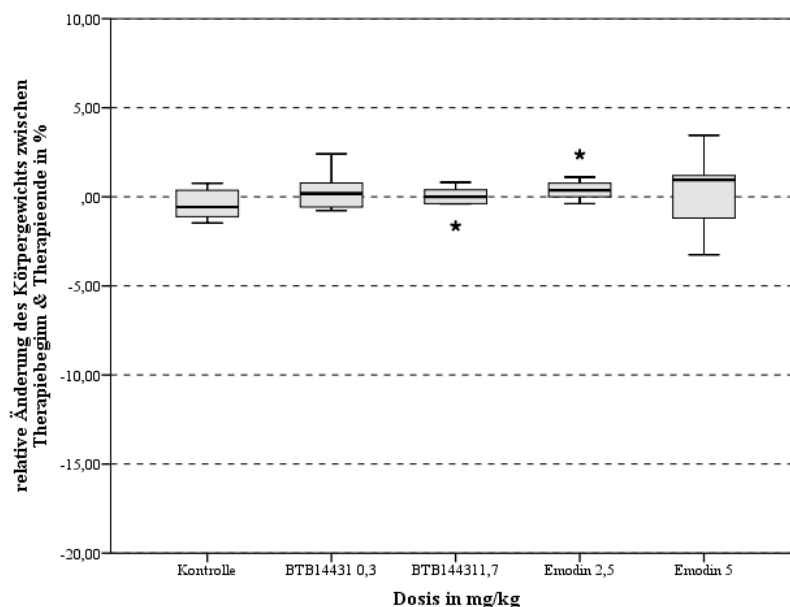


Abb. 16: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapiebeginn und Therapieende.

Im Therapiezeitraum stagnierten die Körpergewichte der Tiere aller Gruppen nahezu. Es waren geringfügige Schwankungen erkennbar. Dabei stieg das Körpergewicht der Tiere der Gruppe VIII (Emodin 2,5 mg/kg KG) an, während das Gewicht der Tiere der Kontrollgruppe abfiel. Dieser Unterschied war signifikant.

Die Änderung des Körpergewichts im Anschluss an die Therapie

ip Therapiegruppe	BTB 14431 0,3 mg/kg 1,1 % (0,4 - 1,7 %)	BTB 14431 1,7 mg/kg 1,6 % (0,6 - 7,6 %)	Emodin 2,5 mg/kg 0,7 % (0,1 - 2,1 %)	Emodin 5 mg/kg 1,6 % (0,3 - 2,7 %)
Kontrolle -0,2 % (-1,0 - 0,2 %)	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,01$	$p = 0,95$	$p = 0,023$

Tab. 16: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen im Anschluss an die Therapie mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die exakte Signifikanz.

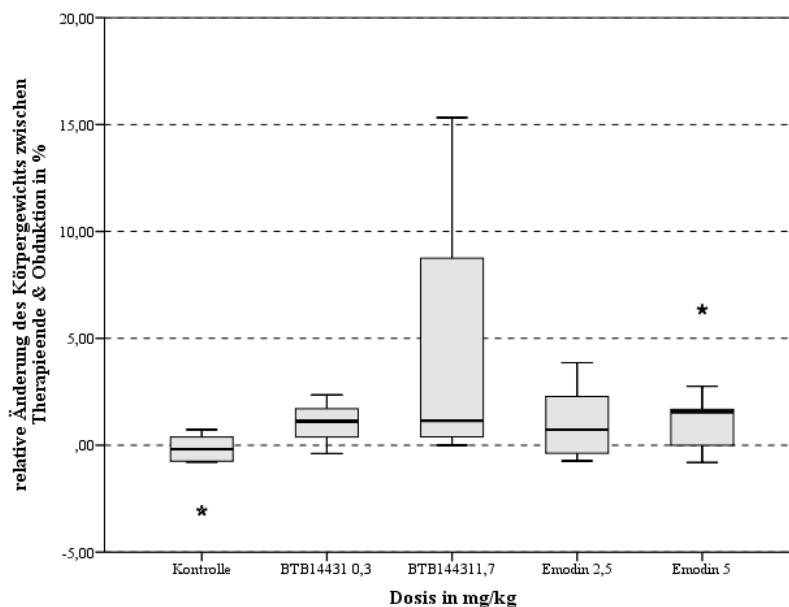


Abb. 17: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapieende und Obduktion.

Das Körpergewicht der Tiere aller Therapiegruppen stieg im Anschluss an die Therapie an, wobei sich bei der Behandlung mit BTB 14431 0,3 mg/kg KG (Gruppe VI), BTB 14431 1,7 mg/kg KG Gruppe VII) und Emodin 5 mg/kg KG (Gruppe IX) ein Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte, bei der das Körpergewicht der Tiere sank. Dabei wies die Körpergewichtsentwicklung der Tiere der Gruppe VII (BTB 14431 1,7 mg/kg KG) die größte Streuung auf. Zum Teil wurde eine Zunahme von 15,3 % registriert. Auch die Tiere der Gruppe VIII (Emodin 2,5 mg/kg KG) wiesen zum Zeitpunkt der Obduktion ein höheres Körpergewicht als am Therapieende auf, dabei ergab sich jedoch kein Unterschied zur Kontrollgruppe.

3.4 Die intravenöse und intraperitoneale Therapie im Vergleich

Von besonderem Interesse war es, zu unterscheiden, welchen Einfluss die Behandlungsform auf das Tumorgewicht und die Gewichtsentwicklung der Tiere hat. Da beide Verfahren Vor- und Nachteile haben, werden die Unterschiede hier im Wesentlichen tabellarisch und grafisch dargestellt.

3.4.1 Die Tumorgewichte

	intravenöse Therapie				intraperitoneale Therapie		
	TG Gesamt	Abd TG	Sc TG		TG Gesamt	Abd TG	Sc TG
Kontrolle	15,9 g (14,5 - 20)	13,5 g (11,1 - 15,8)	4,2 g (3 - 4,7)	Kontrolle	15,8 g (15,4 - 23,3)	15,5 g (12,1 - 19,5)	4 g (2,6 - 4,5)
BTB 14431 0,3 mg/kg	6,8 g (5,3 - 8,2)	4,5 g (3,3 - 5,4)	2,5 g (1,7 - 3,1)	BTB 14431 0,3 mg/kg	13,3 g (10,4 - 17,6)	8,95 g (7,4 - 13,1)	4,1 g (2,7 - 4,8)
BTB 14431 1,7 mg/kg	18,2 g (16,0 - 20,8)	14,1 g (12,7 - 16,8)	3,7 g (3,2 - 4,1)	BTB 14431 1,7 mg/kg	14,3 g (11,5 - 19,3)	11,8 g (8,4 - 15,2)	3,6 g (2,5 - 4,7)
Emodin 2,5 mg/kg	9,4 g (1,9 - 10,4)	7,4 g (6,3 - 8,3)	2,2 g (1,4 - 2,6)	Emodin 2,5 mg/kg	15,8 g (12,7 - 18,1)	11,3 g (8,8 - 13,8)	4,1 g (3,2 - 5)
Emodin 5 mg/kg	8,3 g (7,6 - 9,3)	6,4 g (5,5 - 7,1)	2,2 g (1,5 - 2,7)	Emodin 5 mg/kg	11,1 g (10,1 - 13,8)	8,55 g (6 - 10,4)	3,5 g (2,8 - 4,7)

Tab. 17: Gegenüberstellung aller Tumorgewichte; TG Gesamt - Gesamtumorgewicht; abd TG - abdominales Tumorgewicht; sc TG - subkutanes Tumorgewicht

Tumorgewichte	gesamt	abdominal	subkutan
Kontrolle iv gegen ip	p = 0,661	p = 0,447	p = 0,661
BTB 14431 0,3 mg/kg iv gegen ip	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01	p = 0,043
BTB 14431 1,7 mg/kg iv gegen ip	p = 0,182	p = 0,095	p = 0,720
Emodin 2,5 mg/kg iv gegen ip	p ≤ 0,01	p = 0,010	p ≤ 0,01
Emodin 5 mg/kg iv gegen ip	p ≤ 0,01	p = 0,230	p = 0,033

Tab. 18: Verglichen wurden die Tumorgewichte der einzelnen Therapiegruppen zwischen intravenöser (iv) und intraperitonealer (ip) Applikationsform mittels Mann-Whitney-U-Test.

Wie in Abb. 18 (Seite 44), Abb. 19 (Seite 45) und Abb. 20 (Seite 46) zu sehen ist, fiel bei fast allen intraperitoneal behandelten Tieren, inklusive der Kontrollgruppe, ein höheres Gewicht der Tumore als bei den intravenös behandelten Tieren auf. Lediglich bei Gruppe VII (1,7 mg/kg KG BTB 14431) war das Tumorgewicht z. T. geringer als bei den intravenös behandelten Tieren. Es bestand ein Unterschied aller Tumorgewichte bei der Behandlung mit BTB 14431 0,3 mg/kg KG und Emodin 2,5 mg/kg KG zwischen der intravenösen und intraperitonealen Applikationsform. Die Tumorgewichte waren dabei bei den Tieren mit intravenöser Behandlung signifikant geringer als bei den Tieren mit intraperitonealer Behandlung. Ebenso waren das Gesamttumorgewicht und das subkutane Tumorgewicht bei der Behandlung mit Emodin 5 mg/kg KG unterschiedlich. Auch hier waren die Tumorgewichte bei der intravenösen Behandlung geringer als bei der Intraperitonealen. Bei allen anderen Gruppen war $p > 0,05$. Somit bestand bei diesen Gruppen kein kennzeichnender Unterschied im Gewicht der Tumore zwischen den Applikationsformen. Die Testergebnisse sind in Tab. 17 (Seite 42) und Tab. 18 dargestellt.

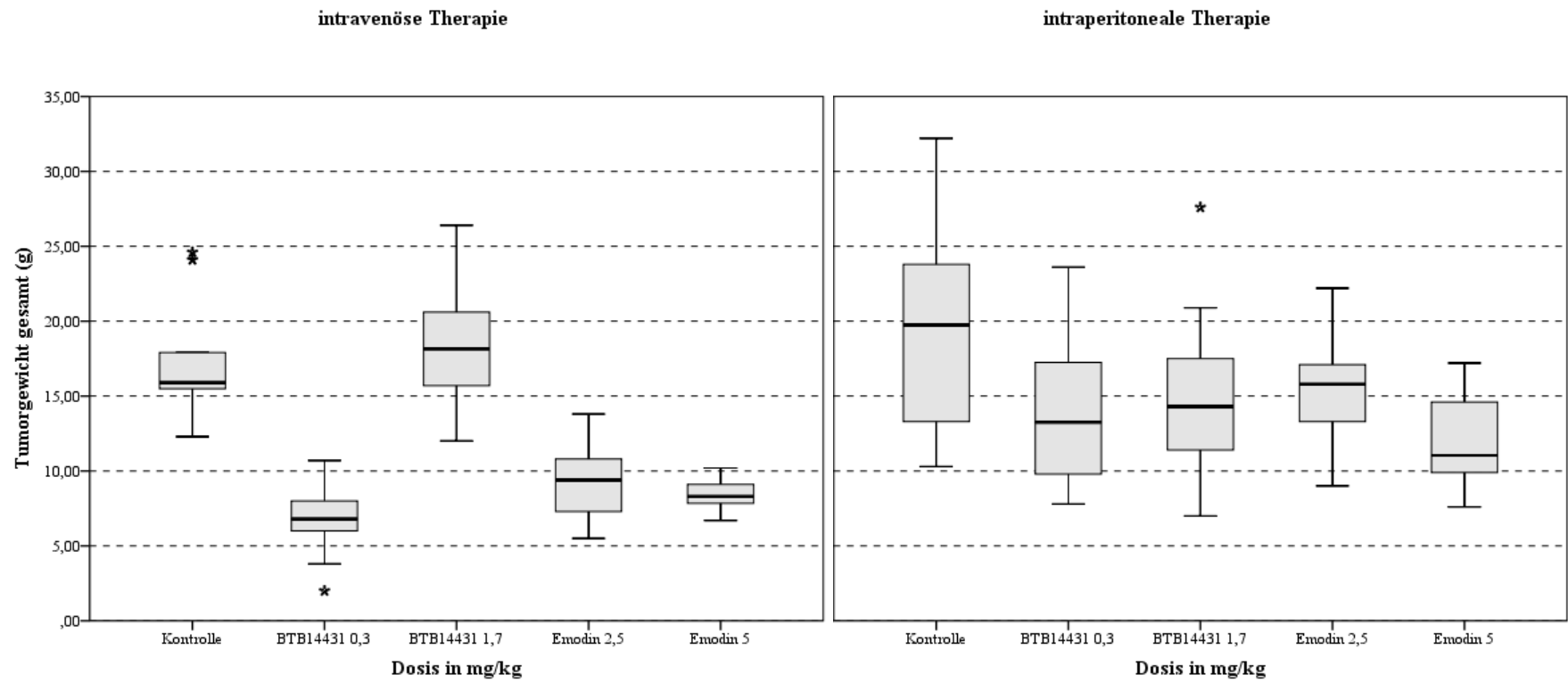


Abb. 18: Gegenüberstellung der Gesamttumorgewichte (g) nach zweimal täglicher intraperitonealer bzw. intravenöser Applikation.

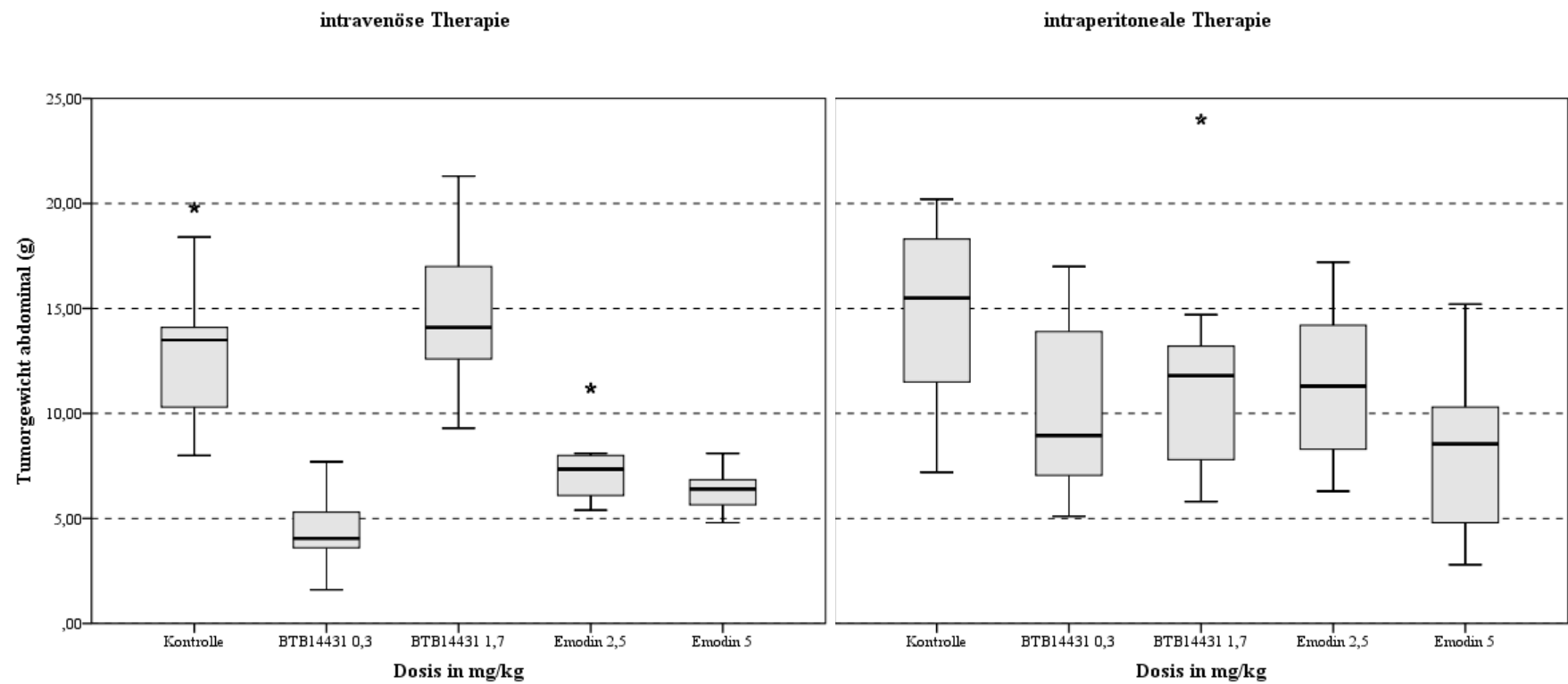


Abb. 19: Gegenüberstellung der Gesamttumorgewichte (g) nach zweimal täglicher intra-peritonealer bzw. intravenöser Applikation.

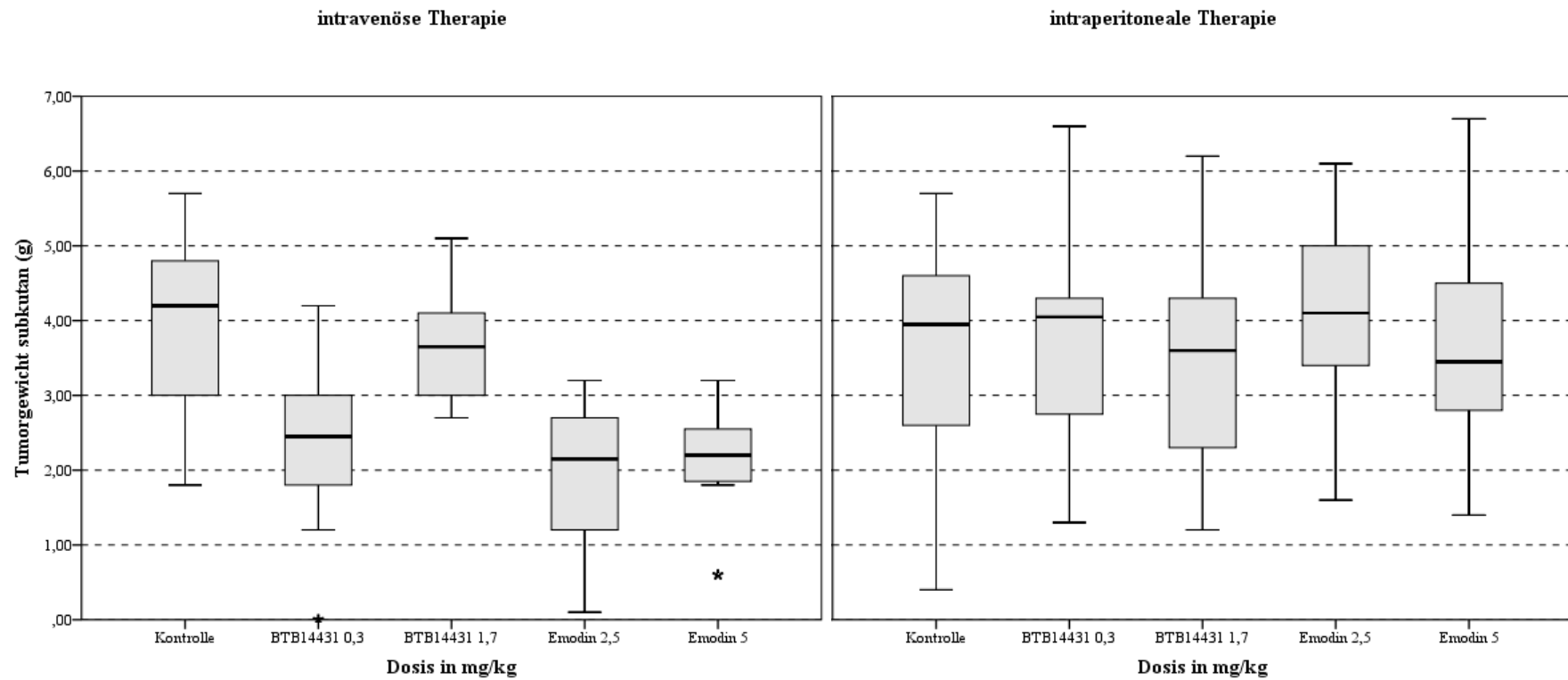


Abb. 20: Gegenüberstellung der Gesamttumorgewichte (g) nach zweimal täglicher intraperitonealer bzw. intravenöser Applikation.

3.4.2 Die Körpergewichte

	intravenöse Therapie				intraperitoneale Therapie		
	rel. Änd. d1T - obd	rel. Änd. d1T - d7T	rel. Änd. d7T - obd		rel. Änd. d1T - obd	rel. Änd. d1T - d7T	rel. Änd. d7T - obd
Kontrolle	-1,9 % (-2,7 - -1,2)	-5,2 % (-5,8 - -3,0)	3,1 % (1,6 - 3,5)	Kontrolle	-0,2 % (-1,7 - 0,2)	-0,6 % (-0,8 - 0,1)	-0,2 % (-1,0 - 0,2)
BTB 14431 0,3 mg/kg	-1,8 % (-2,4 - -0,8)	-5,7 % (-9,7 - -2,2)	4,1 % (1,2 - 8,7)	BTB 14431 0,3 mg/kg	1,0 % (0,2 - 2,6)	0,2 % (-0,4 - 1,0)	1,1 % (0,4 - 1,7)
BTB 14431 1,7 mg/kg	-0,4 % (-1,3 - 1,4)	-3,1 % (-4,2 - -2,6)	3,1 % (2,8 - 4,3)	BTB 14431 1,7 mg/kg	0,8 % (0,6 - 7,6)	0,0 % (-0,5 - 0,5)	1,6 % (0,6 - 7,6)
Emodin 2,5 mg/kg	0,2 % (-2,3 - 1,7)	-5,1 % (-6,5 - -4,4)	5,0 % (4,1 - 6,8)	Emodin 2,5 mg/kg	1,1 % (0,3 - 3,0)	0,4 % (0,1 - 1,1)	0,7 % (0,1 - 2,1)
Emodin 5 mg/kg	-0,4 % (-4,1 - 2,2)	-4,9 % (-7,5 - -3,2)	3,7 % (2,2 - 7,0)	Emodin 5 mg/kg	2,7 % (0,5 - 3,3)	1,0 % (-0,7 - 1,6)	1,6 % (0,3 - 2,7)

Tab. 19: Gegenüberstellung der Gewichtsentwicklung; rel. Änd. d1T – obd: relative Änderung des Körpergewichts zwischen Therapiebeginn und Obduktion; rel. Änd. d1T – d7T: relative Änderung des Körpergewichts im Therapiezeitraum; rel. Änd. d7T – obd: relative Änderung des Körpergewichts im Anschluss an die Therapie

Relative Gewichtsänderungen	Zw. Therapiebeginn & Obduktion	Zw. Therapiebeginn & Therapieende	Zw. Therapieende & Obduktion
Kontrolle iv gegen ip	p = 0,079	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01
BTB 14431 0,3 mg/kg iv gegen ip	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01	p = 0,012
BTB 14431 1,7 mg/kg iv gegen ip	p = 0,028	p ≤ 0,01	p = 0,243
Emodin 2,5 mg/kg iv gegen ip	p = 0,211	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01
Emodin 5 mg/kg iv gegen ip	p = 0,161	p ≤ 0,01	p = 0,025

Tab. 20: Verglichen wurden die relativen Gewichtsveränderungen der einzelnen Therapiegruppen zwischen intravenöser und intraperitonealer Applikationsform mittels Mann-Whitney-U-Test.

Die relativen Gewichtsveränderungen in den verschiedenen Zeiträumen, die bereits in Kapitel 3.2.2 (Seite 33) und 3.3.2 (Seite 39) abgehandelt wurden, zeigen im Vergleich der beiden Applikationsformen, dass die Gewichte der intraperitoneal behandelten Tiere deutlich geringeren Schwankungen unterlagen. Dies ist durch die in Tab. 19 (Seite 47) zusammengefassten Werte nachvollziehbar. Außerdem zeigen auch die in Tab. 20 (Seite 47) dargestellten Signifikanzen diesen Trend. Hierbei unterscheiden sich die relativen Gewichtsveränderungen zwischen den beiden Applikationsformen im Zeitraum zwischen Therapiebeginn und Therapieende sowie Therapieende und Obduktion bei den Kontrollgruppen und den Gruppen, die eine Behandlung mit Emodin 2,5 mg/kg KG und Emodin 5 mg/kg KG erhielten, voneinander. Das Körpergewicht der Tiere, die eine intravenöse Behandlung erhielten, fiel während der Therapie deutlich ab und stieg im Zeitraum zwischen Therapieende und Obduktion wieder an, während sich das Körpergewicht der Tiere mit intraperitonealer Behandlung in diesen Zeiträumen nahezu nicht veränderte. Das Gleiche ist bei der Behandlung mit BTB 14431 0,3 mg/kg KG in allen drei Zeiträumen der Fall. Bei den Gruppen, die eine Behandlung mit BTB 14431 1,7 mg/kg KG erhielten, gibt es ebenfalls diesen Unterschied bei der Gewichtsentwicklung zwischen den Applikationsformen in den beiden Zeiträumen Therapiebeginn bis Obduktion und Therapiebeginn bis Therapieende.

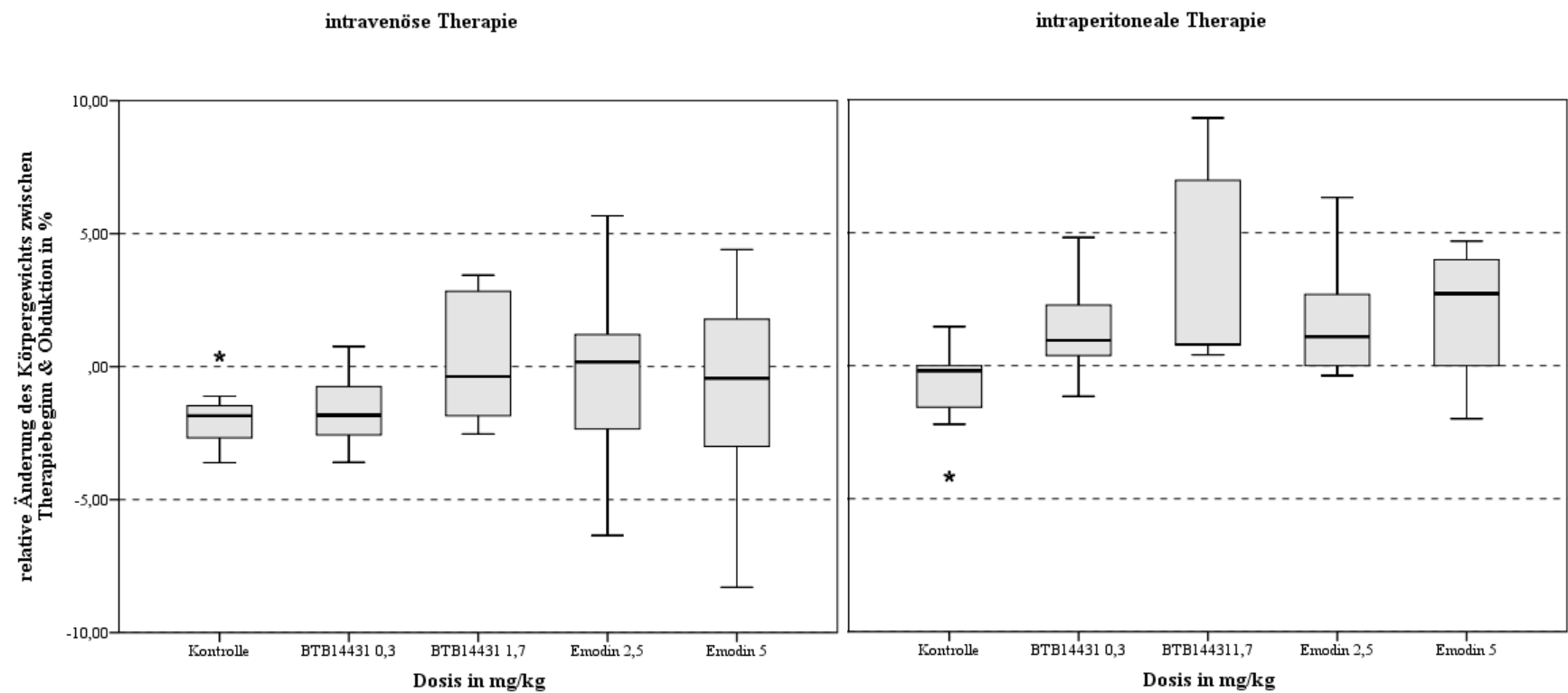


Abb. 21: Gegenüberstellung der relativen Gewichtsveränderungen zwischen Therapiebeginn und Obduktion bei intraperitonealer bzw. intravenöser Behandlung.

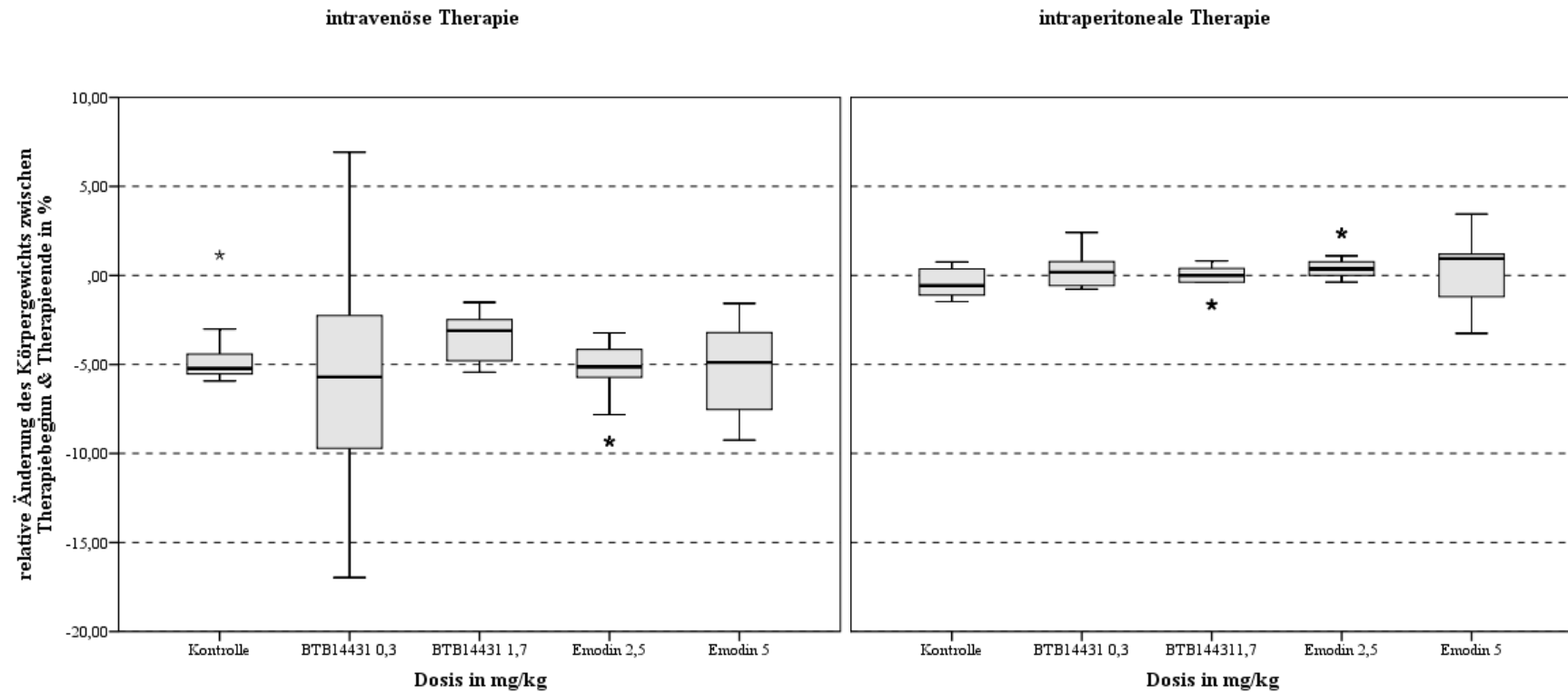


Abb. 22: Gegenüberstellung der relativen Gewichtsveränderungen zwischen Therapiebeginn und Therapieende bei intraperitonealer bzw. intravenöser Behandlung.

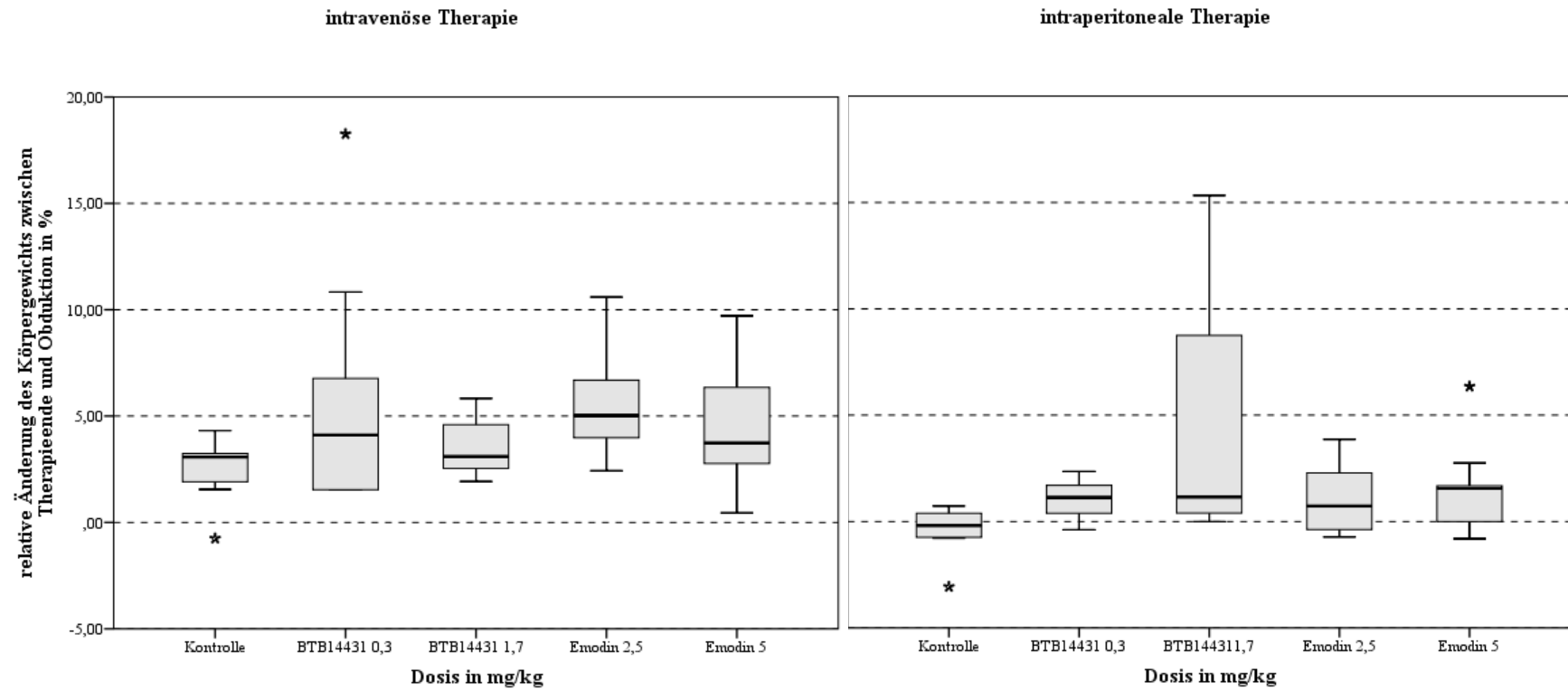


Abb. 23: Gegenüberstellung der relativen Gewichtsveränderungen zwischen Therapieende und Obduktion bei intraperitonealer bzw. intravenöser Behandlung.

4. Diskussion

Das Versuchsmodell mit dem verwendeten Rattenstamm WAG-Rij sowie der verwendeten Zelllinie CC-531 ist bereits etabliert für die Untersuchung des Kolorektalen Karzinoms bei der Ratte [35; 90; 141; 162; 170]. In dem vorliegenden Experiment wurde ein fortgeschrittenes Tumorstadium simuliert. Zwischen der Instillation der Tumorzellen in den Bauchraum und der Behandlung der Tiere bestand ein Abstand von drei Wochen, sodass sich solide Tumore ausbilden konnten. Nach einer einwöchigen intermittierenden intravenösen bzw. intraperitonealen Therapie mit den untersuchten Substanzen Emodin und BTB 14431, die in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen angewendet wurden, wurde weitere drei Wochen bis zur Obduktion der Tiere und Bestimmung der Tumorgewichte abgewartet.

4.1 Tumorgewichte und der Einfluss von Dosissteigerungen

Es konnte ein dosisabhängiger Einfluss von Emodin und BTB 14431 auf das Tumorstadium festgestellt werden. Es zeigten sich Unterschiede zwischen den Applikationsarten und den verschiedenen angewendeten Dosen der untersuchten Substanzen.

BTB 14431 wurde bisher einmalig von Pohlenz 2010 *in vivo* untersucht [142]. Die Festlegung der Dosis von BTB 14431 erfolgte unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Pohlenz. Da BTB 14431 in der Dosierung von 3,3 mg/kg KG paradoxe Ergebnisse zeigte, bei denen die Tumormasse bei der intravenösen Applikation nicht wie erwartet verringert wurde, sondern tendenziell anstieg, wurde diese Dosierung nicht mehr in Erwägung gezogen. Bei Emodin wurden ebenfalls die Ergebnisse von Pohlenz berücksichtigt, da bisher keine vergleichbaren Studien mit der intravenösen Injektion von Emodin veröffentlicht wurden. Bei vorliegenden *in vitro*- und *in vivo*-Tests von Cha *et al.* 2005 [21] und Zhang *et al.* 2005 [202] wurde DMSO als Lösungsmittel bei einer intraperitonealen Applikation, oder aber ein speziell entwickeltes und patentiertes Lösungsmittel für eine intravenöse Verabreichung von Emodin verwendet. Pohlenz verwendete eine 5 %ige PVP-Lösung als Lösungsmittel, um eine intravenöse Applikation von Emodin zu ermöglichen [142]. Da alle Tiere verstarben, die eine Behandlung mit Emodin 10 mg/kg erhielten, wurde diese Dosierung im vorliegenden Experiment ausgeschlossen und die Untersuchung aufgrund der von Pohlenz beobachteten toxischen Nebenwirkungen von Emodin 5 mg/kg bei intravenöser Applikation durch Emodin 2,5 mg/kg ergänzt [142]. Auswirkungen einer längeren intravenösen Emodingabe in dieser Konzentration wurden bisher nicht untersucht. Park *et al.* 2005 untersuchten lediglich für einen Zeitraum von 12 Stunden die antiinflammatorische Wirkung von Emodin auf eine

induzierte nekrotisierende Pankreatitis [136]. Emodin führte dabei zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit.

Als Parameter zur Untersuchung des Einflusses von Substanzen auf die Tumorangio-genese kann man das Tumorgewicht bestimmen [163]. Albrecht zeigte 2008 eine Korrelation zwischen der Mikrogefäßdichte und dem Tumorgewicht. Bei der Behandlung von Pankreaskarzinomzellen (L3.6pl) im Nacktmausmodell mit SB22502 und Gemcitabine konnte eine signifikante Verringerung der Tumorgewichte nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Analyse mittels CD31-Färbung zeigte eine deutliche Abnahme der Mikrogefäßdichte bei den Therapiegruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe [5].

In der vorliegenden Untersuchung waren bei der intravenösen Behandlung mit BTB 14431 0,3 mg/kg KG und Emodin in beiden Dosierungen sowohl das Gesamtumorgewicht als auch das abdominale und subkutane Tumorgewicht einzeln betrachtet signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe. Bei der intraperitonealen Behandlung waren lediglich bei der höheren Konzentration von Emodin das Gesamtumorgewicht und das abdominale Tumorgewicht geringer als bei der Kontrollgruppe. Bei allen anderen Therapiegruppen zeigten sich keine Unterschiede in den Tumorgewichten zur Kontrollgruppe.

Bei der Gruppe, die eine Behandlung mit BTB 14431 1,7 mg/kg KG intravenös erhielt, konnte kein Effekt auf das Gesamtumorgewicht und das abdominale Tumorgewicht beobachtet werden. Tendenziell waren die Gewichte der abdominalen Tumore sowie die Gesamtumorgewichte dieser Gruppe höher als die der Kontrollgruppe. Bei den Tieren der anderen Gruppen waren tumormasseverringende Effekte sichtbar. Dieser Unterschied hängt vermutlich mit der Zufälligkeit des Tumorwachstums der Stichprobe zusammen. Des Weiteren könnte dies ein Hinweis auf vermehrte Toxizität im Vergleich zu BTB 14431 0,3 mg/kg KG und mögliche immunmodulatorische Eigenschaften von BTB 14431 in höheren Dosierungen sein. Pohlenz zeigte ebenfalls diesen Effekt von BTB 14431 in hohen Konzentrationen [142]. Der Median des abdominalen Tumorgewichts bei der Behandlung mit 3,0 mg/kg KG BTB 14431 war doppelt so hoch wie der Median der Kontrollgruppe. Pohlenz führte diesen Effekt auf die zunehmende Aktivierung von *Reactive-Oxygen-Species* (ROS) durch Emodin und BTB 14431 sowie auf eine vermehrte Belastung des Immun- und Kreislaufsystems durch den gesteigerten Stoffwechsellaufwand für die Auseinandersetzung mit dem Wirkstoff zurück. Emodin führt bei humanen Leberkrebszellen (HepG2) zu einer dosisabhängigen Akkumulation von intrazellulären ROS [196]. Auch bei anderen Zelllinien spielt die Bildung von ROS eine entscheidende Rolle. So z.B. bei Lungenadenokarzinomzellen (A549) und HeLa-Zellen [167; 191].

Vergleicht man die Ergebnisse der intravenösen Behandlung mit denen der intraperitonealen Behandlung, ist ein Unterschied erkennbar. Bei der intravenösen Therapie mit 0,3 mg/kg KG BTB 14431 bzw. mit 2,5 mg/kg KG Emodin sind alle Tumorgewichte geringer als bei der intraperitonealen Therapie. Bei der intraperitonealen Behandlung kommt es lediglich bei einer Dosis von 5 mg/kg Emodin zu einer Reduktion des Gesamttumorgewichts und der abdominalen Tumorgewichte. Betrachtet man das subkutane Tumorgewicht einzeln, gibt es ebenfalls einen Unterschied zwischen den Applikationsarten. Bei der intravenösen Therapie mit 2,5 mg/kg KG sowie 5 mg/kg KG Emodin und bei der Behandlung mit 0,3 mg/kg KG BTB 14431 wurde ein tumorreduzierender Effekt beobachtet, hingegen scheint die intraperitoneale Therapie keinen Effekt auf das subkutane Tumorwachstum zu haben.

Solide Tumore verfügen über ein eigenes Gefäßnetz, wodurch sie durch intravenös verabreichte Substanzen anscheinend besser erreicht werden als durch intraperitoneal verabreichte. Eine lokoregionäre intraperitoneale Therapie wird zu einem Großteil resorbiert und hat dadurch eine ebenfalls systemische Wirkung. Es ist jedoch unklar, ob am Tumor eine wirksame Dosis erreicht wird. Dieses steht im Gegensatz zu der Studie von Pohlentz, bei der eine stärkere Wirksamkeit der gleichen Substanzen bei intraperitonealer Applikation nachgewiesen werden konnte [142]. In dieser Studie wurde die Behandlung jedoch direkt nach Zellapplikation begonnen und zielte somit auf nicht vaskularisierte Tumore ab. Fehlt das Gefäßnetz im Tumor, so kann der Wirkstoff nicht über dieses in den Tumor eindringen. Freie vitale Tumorzellen können aber von einer intraperitoneal applizierten Lösung besser umschlossen werden. Die intraperitoneal verabreichten Wirkstoffe könnten so die Tumorzellen abtöten, oder die frühe Tumorangiogenese hemmen und die Ausbildung eines Gefäßnetzes behindern. Bei einem Modell mit verzögertem Behandlungsbeginn und somit ausgebildeten soliden Tumoren, erreichen die Wirkstoffe bei intravenöser Applikation die Tumore direkt über das Gefäßnetz, könnten so möglicherweise die weitere Angiogenese hemmen und das Wachstum bereits bestehender Gefäße beeinflussen. Bei einer intraperitonealen Behandlung bereits vaskularisierter Tumore ist es möglich, dass die Wirkstoffe nur oberflächliche Zellen erreichen und so keine effektive Hemmung des Tumorwachstums bewirken können. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse verschiedener Xenograft-Modelle an Nacktmäusen, die eine Verringerung des Tumorumfanges und Tumorgewichts bei intermittierender intraperitonealer Behandlung mit Emodin nachweisen konnten [28; 201].

4.2 Mortalität, Veränderungen des Gewichts der Tiere und Toxizität

Sieben Tiere starben im Laufe der 7tägigen Behandlung. Davon starb ein Tier an Herz-Kreislaufversagen während der intravenösen Applikation von 5 mg/kg KG Emodin. Die anderen sechs Tiere starben unabhängig von therapeutischen Maßnahmen und wurden tot im Käfig aufgefunden. Die Verteilung auf die Gruppen war dabei folgendermaßen: es verstarben drei Tiere der Gruppe IV (intravenöse Therapie mit 5 mg/kg KG Emodin), zwei Tiere der Gruppe VI (intraperitoneale Therapie mit 0,3 mg/kg KG BTB 14431), ein Tier der Gruppe VII (intraperitoneale Therapie mit 1,7 mg/kg KG BTB 14431) und ein Tier der Gruppe VIII (intraperitoneale Therapie mit 2,5 mg/kg KG Emodin). Aufgrund dieser Verteilung lassen sich keine Aussagen über die toxikologischen Nebenwirkungen von Emodin und BTB 14431 in den untersuchten Konzentrationen machen. Ein weiteres Tier starb ebenfalls an Herz-Kreislaufversagen während der Portimplantation.

Betrachtet man die Veränderungen des Körpergewichts der Tiere, die eine intravenöse Behandlung erhielten im Zeitraum zwischen Therapiebeginn und Therapieende, gibt es keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Alle Tiere verloren etwa 5 % ihres Körpergewichts. Im darauffolgenden Zeitraum zwischen Therapieende und Obduktion stieg das Körpergewicht bei allen Tieren deutlich an. Gruppe III (Emodin 2,5 mg/kg KG) zeigte einen signifikant stärkeren Anstieg des Körpergewichts als die Kontrollgruppe. Betrachtet man den Zeitraum vom Beginn der Behandlung bis zur Obduktion, verringerte sich das Gewicht der Tiere nur geringfügig. Es gab keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe, tendenziell verloren aber alle Gruppen bis auf Gruppe I (BTB 14431 0,3 mg/kg KG) weniger an Gewicht als die Kontrollgruppe.

Der Effekt der Gewichtsabnahme während der Therapie und der folgenden Gewichtszunahme, zeigte sich bei den Gruppen, die eine intraperitoneale Applikation erhielten nicht. Dieser Unterschied zwischen den Applikationsformen ist signifikant. Bei der intraperitonealen Behandlung waren im Therapiezeitraum nur geringe Körpergewichtsveränderungen der Tiere zu verzeichnen. Das Gewicht der Tiere der Therapiegruppen stieg aber tendenziell an, während das Gewicht der Kontrolltiere sank. Bei Gruppe VIII (Emodin 2,5 mg/kg KG) war der Unterschied signifikant. Zwischen Therapiebeginn und Obduktion stieg das Körpergewicht hingegen bei allen intraperitoneal mit Emodin bzw. BTB 14431 behandelten Gruppen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Dies könnte ein Hinweis auf die Beeinflussung der intravenös behandelten Tiere durch frei wirksame Metabolite der Isoflurannarkose sein. Im Zeitraum zwischen Therapieende und Obduktion ist dies ebenfalls mit Ausnahme der Gruppe VIII (Emodin 2,5 mg/kg KG) der Fall, bei der das Körpergewicht in diesem Zeitraum nur geringfügig anstieg. Es ist jedoch zu berücksichtigen,

dass es sich dabei lediglich um Zunahmen im Bereich zwischen 1 und 2 % des Körpergewichts handelte und die Tumorgewichte der intraperitoneal behandelten Gruppen signifikant höher waren als in den intravenös behandelten Gruppen. Da die Tendenzen sich jedoch in allen Therapiegruppen zeigen und vor allem ein signifikanter Unterschied zu den intravenös behandelten Tieren besteht, lassen sie die vorsichtige Aussage zu, dass die intraperitoneale Therapie besser verträglich ist als eine intravenöse. Doch auch hier müssen die höheren Tumorgewichte bei den intraperitoneal behandelten Tieren berücksichtigt werden.

Eine Korrektur der Tiergewichte um das Tumorgewicht ist aufgrund des Versuchsaufbaus nicht möglich. Da die Tumorgewichte nur zu Versuchsende bestimmt wurden und nicht zu den anderen Zeitpunkten, kann lediglich ein Vergleich der absoluten Tiergewichte erfolgen und nicht der korrigierten Gewichtsverläufe.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich zwar keine sichere Aussage über die toxikologische Wirkung der untersuchten Substanzen treffen, eine Tendenz wird jedoch deutlich. Sowohl Emodin als auch BTB 14431 scheinen die Ausprägung einer Tumorkachexie einzugrenzen und die toxikologischen Auswirkungen der untersuchten Substanzen auf die Tiere scheinen so gering zu sein, dass sie sich in der Tiergewichtsentwicklung nicht zeigen. Eine Studie mit Prostatakarzinomzellen bestätigte die Wirkpotenz von Emodin. Mit Emodin behandelte Mäuse überleben signifikant länger als Tiere der Kontrollgruppe, hatten eine höhere Gewichtszunahme und waren deutlich aktiver [21].

Potentielle Nebenwirkungen

Die bei der intravenösen Applikation aufgetretenen Todesfälle sind auf die Abnahme der Atemfrequenz und Atemtiefe im Rahmen der Isoflurannarkose zurückzuführen. Diese führte bei zwei Tieren der Gruppe IV (Emodin 5 mg/kg KG) während der Durchführung der Therapie zur Hypoxie und respektive zum Versterben (siehe Tab. 4, Seite 29). Die beobachteten Abszesse im Portreservoir und um die Einstichstelle entstanden vermutlich durch Wundinfektion. Die Ports wurden zwar steril implantiert, das OP-Feld wurde jedoch rasiert, was zu Mikroläsionen führen kann, die einen Bakterieneintritt begünstigen.

Pohlentz untersuchte 2010 in ihrer Studie auch Auswirkungen auf das Blutbild der Tiere. Sie untersuchte das Blut der Tiere vor dem operativen Eingriff und zu Behandlungsende in Hinblick auf eine prozentuale Veränderung verschiedener Blutwerte [142]. Die Leukozytenzahl stieg in allen Gruppen, bis auf die Gruppe, die eine intravenöse Behandlung mit BTB 14431 3,3 mg/kg KG erhielt, an. Die Thrombozytenzahl stieg ebenfalls in allen Gruppen, bis auf die Gruppe, die eine intraperitoneale Behandlung mit Emodin 10 mg/kg KG erhielt, an. Diese Beobachtungen waren jeweils in den intravenös behandelten Gruppen

stärker, aber nicht signifikant ausgeprägt. Bei den Erythrozyten und dem Hämatokrit gab es keine gruppenspezifischen Veränderungen. Das Differentialblutbild zeigte ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede. Tendenziell nahmen die Lymphozyten und Monozyten in allen Gruppen leicht ab, wohingegen sich der relative Anteil an neutrophilen Granulozyten erhöhte. Um die Tierzahlen zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit Bezug auf diese Ergebnisse genommen und keine weiteren Untersuchungen dieser Art durchgeführt.

Yu *et al.* untersuchten 2006 den Einfluss von Emodin auf die Leukozyten von Sprague-Dawley-Ratten [193]. Mittels einer Leukozytenzellkultur, die sie 1-6 Stunden inkubierten, prüften sie die Wirkung von Emodin in verschiedenen Konzentrationen auf drei Parameter. Eine bis zu vierstündige Inkubation mit Emodin führte zu einem Abfall der Phagozytoseaktivität der Makrophagen, eine Inkubation von sechs Stunden hingegen erhöhte diese. Emodin steigerte die Aktivität der Natürlichen Killerzellen und führte zu einem Anstieg der Konzentrationen von IL-1- β und TNF- α . Alle Effekte waren dosisabhängig.

Toxikologische Untersuchungen und Studien zur Karzinogenese bei oraler Gabe von Emodin an Mäusen und Ratten ergaben eine erhöhte Inzidenz an hyalintropfiger Eiweißspeicherung und verstärkter Pigmentierung der Nierentubuli bei der Gabe verschiedener Konzentrationen von Emodin über einen Zeitraum von 16 Tagen, über 14 Wochen, bis hin zu 2 Jahren. Über den gesamten Zeitraum gab es keinen Hinweis auf karzinogenes Potential. Bei weiblichen Ratten wurde lediglich eine leicht erhöhte Inzidenz an Zymbaldrüsenkarzinomen festgestellt und bei männlichen Mäusen wurde ein geringfügig erhöhtes Auftreten von verschiedenen Nierentubulusneoplasien beobachtet [129].

Das im Laufe des vorliegenden Experiments aufgetretene plötzliche Versterben von Tieren, könnte auf ein akutes Nierenversagen zurückzuführen sein. Aber auch bisher unbekannte Eigenschaften der applizierten Substanzen kommen als Grund für das Versterben der Tiere in Frage. Einwirkungen von außen und die Applikation von Substanzen verändern den Allgemeinzustand des Tieres, wodurch sich die Nahrungs- und Wasseraufnahme des Tieres im Behandlungszeitraum verändert. Je nach Intensität der Effekte, könnte auch dies Mitursache sein.

4.3 Unterschiede zur Behandlung direkt nach Zellapplikation

Im Rahmen eines vorangegangenen Versuchs in der Arbeitsgruppe konnte die tumorsupprimierende Wirkung von Emodin und BTB 14431 nicht bestätigt werden. Dabei wurde die Behandlung direkt nach der Applikation der Zellsuspension begonnen. BTB 14431 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen untersucht: 0,3 mg/kg KG, 1,7 mg/kg KG und 3,3 mg/kg KG. Emodin wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen untersucht: 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG. Bei der Obduktion 3 Wochen nach Behandlungsende konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Es konnte lediglich ein tendenziell vermindertes subkutanes und abdominales Tumorwachstum nach intravenöser Behandlung mit BTB 14431 0,3 mg/kg KG und Emodin 5 mg/kg KG festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch ein deutlich geringeres abdominales Tumorwachstum bei den intraperitoneal behandelten Tieren im Vergleich zu den intravenös behandelten Tieren.

Aufgrund des Versuchsaufbaus handelte es sich nicht um bereits vaskularisierte solide Tumore. In der avaskulären Phase, in der Tumore einen Durchmesser von unter 2 mm aufweisen, wächst der Zellhaufen zunächst unabhängig von der Bildung neuer Blutgefäße. Er befindet sich im angiogenen Gleichgewicht und die Versorgung der Zellen wird durch Diffusion sichergestellt. Eine weitere Größenzunahme ist dann jedoch nur durch die Induktion von Angiogenese möglich [131]. Somit ist eine Mindestgröße der Tumore Voraussetzung für die Wirksamkeit von Angiogenesehemmern. Aus diesem Grund wurde das bisherige Studiendesign abgewandelt. Nach der Injektion der Zellen wurde eine Wartezeit von 3 Wochen bis zum Behandlungsbeginn eingeschoben. Dadurch hatten die Zellen Zeit anzuwachsen und solide Tumore mit Gefäßversorgung auszubilden.

4.4 Folgerungen und Ausblick

Komplexe zelluläre und molekulare Interaktionen zwischen Tumorzellen, Endothelzellen und den Komponenten der extrazellulären Matrix sind am angiogenen Switch beteiligt. Besonders zu erwähnen sind dabei auch spezifische Proteine, die durch die Tumorzellen sezerniert werden und in der Lage sind, die Proliferation von kapillären Endothelzellen zu stimulieren. Die gleichzeitige Behandlung von Tumor- und Endothelzellen könnte effektiver sein als eine alleinige Therapie der beiden [52; 159].

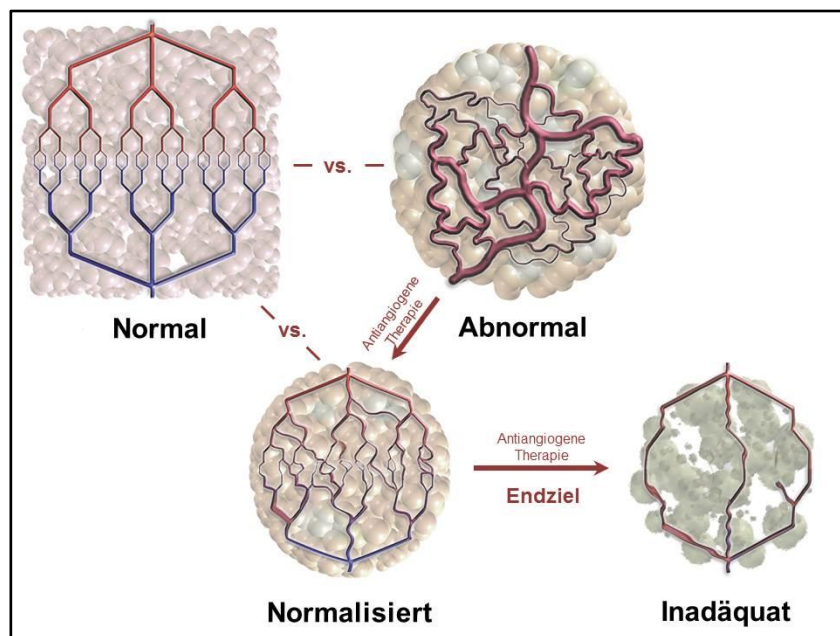


Abb. 24: Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen einem normalen Gefäßnetz, dem abnormalen Gefäßnetz von Tumoren, dem normalisierten Gefäßnetz nach oder während antiangiogener Therapie und dem inadäquaten Gefäßnetz, das im besten Falle bei weiterer antiangiogener Therapie entsteht und weiteres Tumorgewachstum verhindert. Das normale Gefäßnetz wird durch die Balance zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren aufrechterhalten und möglicherweise nicht von einer antiangiogenen Therapie beeinflusst. Die abnormale Struktur eines Tumorgefäßnetzes ist gekennzeichnet durch unreife Gefäße mit erhöhter Permeabilität, erhöhtem interstitiellen Druck, erhöhtem Gefäßdurchmesser sowie durch eine erhöhte Gefäßlänge und verstärkte Windung der Gefäße, wodurch die Diffusion von Therapeutika und Nährstoffen in das Gewebe erschwert wird (modifiziert nach Jain *et al.* 2001 [79]).

Die Gefäße in Tumoren sind strukturell und funktionell verändert und chaotisch angeordnet. Durch exzessives Endothelzellwachstum bildet sich ein schlecht organisiertes Netz, dessen Gefäße teilweise dilatiert und hyperpermeabel sind [10]. Durch die anormale Struktur, fehlende Koordination des Gefäßtonus und die Einengung der Gefäße durch das Tumorgewebe steigt der Gefäßwiderstand und es kommt zu einer schlechteren Durchblutung des Gewebes [79]. Diese Veränderungen führen letzten Endes zu der

Unfähigkeit von Tumorgefäßen, Druckgradienten zwischen Interstitium und dem Blutgefäß zu regulieren, was zu einem erhöhten interstitiellen Druck führt. Dadurch können Sauerstoff und Makromoleküle schlechter diffundieren [78]. Da Wirkstoffe die neoplastischen Zellen innerhalb des Tumors so nur ungleichmäßig erreichen, könnte dieses Strukturchaos einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Therapeutika haben. Einige Angiogenesehemmer sind in der Lage, das Strukturchaos zu normalisieren und in ein strukturierteres Gefäßnetz umzuwandeln und somit für konventionelle Chemotherapeutika besser zugänglich zu machen [79]. VEGF spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Integrität der Gefäßwand. Eine Hemmung des VEGF oder seines Rezeptors führt zur Apoptose von Endothelzellen und verringert den Gefäßdurchmesser sowie die Permeabilität der Gefäßwand. Dies führt zu einer Verringerung des Gefäßwiderstandes und zu einer Senkung des interstitiellen Drucks, wodurch Wirkstoffe besser in das Gewebe eindringen können [80; 100; 172; 197]. Während einer antiangiogenen Behandlung normalisiert sich die Struktur der Blutgefäße im Tumor [81]. Nach der Behandlung kann jedoch eine zweite angiogene Welle beobachtet werden, bei der die überlebenden Tumorzellen proliferieren und Angiogenesefaktoren ausschütten [81; 176]. Die Gefäße des residualen Tumors zeigen wieder die gleichen Abnormalitäten wie vor der Therapie. Ziel ist es also, die Therapie durch Kombination mehrerer Substanzen und mehrerer Etappen solange durchzuführen, bis alle Gefäße zurückgebildet sind und der Tumor in einen inaktiven Zustand übergeht, der mit einem „schlafenden Tumor“ („dormant tumor“) vergleichbar ist [79].

Auch Zytostatika greifen teilende Zellen wie zum Beispiel Endothelzellen an und haben somit auch einen indirekten antiangiogenen Effekt [9]. Tumore sind in der Lage, direkte Resistenzen gegen Zytostatika zu entwickeln. Angiogenesehemmer wirken indirekt auf den Tumor, indem sie seine Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr negativ beeinflussen, ihn so am Weiterwachsen hindern und zu Nekrosen von Tumorgewebe führen können. Es kommen jedoch verschiedene Mechanismen in Frage, über die Tumore auch die Wirkung einer antiangiogenen Therapie umgehen können. Dazu gehört die Bildung anderer proangiogener Faktoren im Überschuss, was zur Angiogenese trotz der Hemmung von zum Beispiel VEGF führen kann [88]. Ebenfalls in Betracht kommt die Entwicklung eines erhöhten Prozentsatzes an reifen, stabilen Blutgefäßen, die weniger auf eine antiangiogene Therapie ansprechen [59], sowie die Entwicklung hypoxieresistenter Tumorzellen, die weniger von der Tumorangio-genese abhängig sind [194]. Eine Monotherapie gegen einen proangiogenen Faktor kann also zur vermehrten Expression und Stimulation anderer proangiogener Faktoren und Signalwege führen [147]. Dies könnte eine Erklärung für die geringe Wirksamkeit der von uns untersuchten Substanzen sein. Es ist möglich, dass die Expression von VEGF durch die Anwendung von BTB 14431 und Emodin dosisabhängig gehemmt wird. Dass Emodin die Expression von VEGF hemmt, zeigten Suboj *et al.* 2005 [168]. Auch die

Phosphorylierung der Rezeptoren des VEGF wird von Emodin dosisabhängig inhibiert [114]. Dies wurde bereits *in vitro* und auch *in vivo* beschrieben [97; 108]. Lin *et al.* beschrieben des Weiteren, dass Emodin auf die Expression des VEGF-Rezeptors keinen Einfluss hat. [108].

Resistenzen sind von herausragender Bedeutung für die begrenzte Wirksamkeit von Chemotherapien bei verschiedenen Tumoren. Eine Kombination konventioneller Chemotherapeutika mit Emodin führt zu einer Verbesserung der Wirksamkeit. So verstärkt Emodin die durch Cisplatin induzierte und durch ROS vermittelte Apoptose bei humanen Gallenblasenkrebszellen (SGC996) [106]. Außerdem wird die Expression von Survivin in Tumorzellen vermehrt herunterreguliert, ohne dabei toxisch auf normales Gewebe zu wirken [180]. Emodin wirkt synergistisch mit Celecoxib bei der Hemmung des Wachstums von Cholangiokarzinomzellen (C611B) bei Ratten durch eine verbesserte Inaktivierung von AKT und einer gesteigerten Aktivierung von Caspase-9 und -3 [98]. Mit humanen Pankreaskarzinomzellen (SW1990, PANC-1) wurde mittels einer verringerten NF- κ B-Expression eine gesteigerte Wirksamkeit von Gemizitabine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen [62; 109; 182]. Resistenzen gegen Gemizitabine können durch die Kombination mit Emodin sogar aufgehoben werden [110]. Mit der gleichen Zelllinie konnte die auf die Aktivierung von AKT und NF- κ B inhibierende Wirkung auch im Mausmodell nachgewiesen werden [184].

Casanovas *et al.* zeigten 2005 in einem Mausmodell anhand von zwei VEGF-Rezeptorantikörpern, dass eine alleinige Reduktion von VEGF die MVD zwar zunächst verringert, es dann jedoch zur Reaktivierung der Angiogenese und einem Anstieg der MVD auf ein Level kommt, das mit dem von unbehandelten Tumoren vergleichbar ist [20]. Eine Anti-VEGF- oder Anti-VEGF-Rezeptor-Therapie führt zunächst zu einer verminderten Entwicklung neuer Gefäße im Tumor, zu einem verringerten Blutfluss in bestehenden Gefäßen und zu einer Einschränkung des weiteren Wachstums des Tumors. Dadurch kommt es zur Hypoxie im Tumorgewebe, was zur Ausschüttung Hypoxie induzierter proangiogener Faktoren wie z.B. des FGF, des bFGF und Angiopoietin-1 führt. Demzufolge wird Angiogenese trotz fortlaufender Anti-VEGF-Therapie induziert, sodass es zur Revaskularisierung des Tumorgewebes und zum weiteren Wachstum des Tumors kommt. Kerbel und Casanovas zeigten 2005 *in vitro*, dass eine Ergänzung der Anti-VEGF-Therapie um eine Anti-bFGF-Therapie wieder zur Hemmung der Angiogenese führt und der Tumor abermals auf die Therapie anspricht [20; 88].

Die vorliegenden Daten zeigen eine potentielle Wirksamkeit von BTB 14431 und Emodin beim Kolorektalen Karzinom an der Ratte. Dabei scheint in diesem Modell Emodin potenter und besser verträglich zu sein als BTB 14431. Dies ist jedoch dosisabhängig und von der Applikationsart abhängig zu betrachten. Die besten Ergebnisse zeigte die intravenöse Applikation von Emodin in den Dosierungen 2,5 mg/kg KG und 5 mg/kg KG sowie BTB 14431 in der Dosierung 0,3 mg/kg KG.

Um die Wirkung der Substanzen auf die Angiogenese von Tumoren genauer zu untersuchen, wäre eine Erweiterung des Versuchsaufbaus interessant. Drei Wochen nach Zellimplantation und somit vor Beginn der Behandlung sollte Tumorgewebe entnommen, gewogen und histologisch oder immunhistochemisch zum Beispiel mittels CD31 Markierung auf seine Gefäßstruktur und die MVD hin untersucht werden. Das gleiche Prozedere sollte dann mit Tumorgewebe direkt nach der Behandlung und weitere drei Wochen später erfolgen. Somit wäre ein direkter Vergleich von Tumorgewicht und Gefäßstruktur unmittelbar vor und nach der Behandlung sowie nach einer spezifischen Wartezeit möglich. Durch die Untersuchung der Gefäßstruktur und der MVD ließe sich die potentielle Wirkung von BTB 14431 und Emodin genauer differenzieren.

5. Zusammenfassung

Der Einfluss einer intravenösen vs. intraperitonealen Applikation von Emodin und BTB 14431 auf fortgeschrittenes intra- und extraperitoneales Tumorstadium bei Ratten

Zur Therapie des kolorektalen Karzinoms gibt es zahlreiche neue Präparate auf dem Markt, die jedoch häufig Resistenzen und Nebenwirkungen zeigen.

Auf der Suche nach neuen pharmakologischen Substanzen mit verbesserten Eigenschaften wurde in vorhergehenden Experimenten mittels des Kinase-Inhibitors Emodin eine neue Substanz (BTB 14431) durch ein *in silico* Screening entdeckt und bereits einmalig *in vivo* in einem Tumorsuspensionsmodell untersucht.

Verschiedene Studien zeigen, dass Emodin Apoptose induziert, Zellproliferation hemmt sowie Angiogenese unterbindet und somit Tumorstadium reduzieren kann.

In dem hier vorgestellten Tierexperiment wurde nun der Einfluss von Emodin und BTB 14431 auf das Wachstum von fortgeschrittenen Tumoren in Hinblick auf Unterschiede in der Applikationsart und der Dosierung untersucht. Es wurde ein standardisiertes tierexperimentelles Tumormodell etabliert und zunächst die Freisetzung vitaler Tumorzellen durch einen onkotischen Eingriff simuliert. Hierzu erhielten 100 Ratten (WAG-RIJ) eine sterile intraperitoneale Injektion von 10^5 syngenetischen Kolonadenokarzinomzellen (CC-531) mittels Laparotomie. Außerdem erhielten die Tiere eine subkutane Zellinjektion von ebenfalls 10^5 syngenetischen Tumorzellen des gleichen Zelltyps, die periphere Metastasen simulieren sollten. Um den systemischen Einfluss der neu identifizierten Substanz BTB 14431 sowie von Emodin auf solide Tumoren zu untersuchen, wurde die Hälfte der Tiere 28 Tage nach Zellapplikation mittels Ports in der *Vena jugularis externa* über eine Woche in einem 12-stündigen Rhythmus behandelt (Kontrollgruppe: Behandlung mit Ringer-Laktat, Therapiegruppen: Behandlung mit 0,3 mg/kg KG BTB 14431, 1,7 mg/kg KG BTB 14431, Emodin 2,5 mg/kg KG oder Emodin 5 mg/kg KG). Die andere Hälfte der Tiere erhielt die intermittierende Therapie über intraperitoneale Injektionen. Drei Wochen nach Behandlungsende wurden die Tiere euthanasiert und die Tumorgewichte bestimmt.

In diesem Experiment konnte ein dosisabhängiger Einfluss von Emodin und BTB 14431 auf das Wachstum der Tumoren gezeigt werden. Dabei schien Emodin potenter und besser verträglich zu sein als BTB 14431. Dies ist jedoch sowohl von der Dosis als auch von der Applikationsart abhängig. Die besten Ergebnisse zeigten die Gruppen, die Emodin in einer der beiden Dosierungen oder BTB 14431 in der Dosierung 0,3 mg/kg KG intravenös erhielten. Die Tiere dieser Gruppen nahmen mehr an Körpergewicht zu und die Tumore hatten ein geringeres Gewicht als bei der Kontrollgruppe. Des Weiteren konnte bei den

genannten Gruppen eine bessere Wirksamkeit der Behandlung bei intravenöser Applikation im Vergleich zur intraperitonealen Applikation festgestellt werden. Bei den intraperitoneal behandelten Tieren gab es lediglich bei der Behandlung mit 5 mg/kg KG Emodin einen Unterschied im Gewicht der Tumormassen zur Kontrollgruppe. BTB 14431 zeigte bei höherer Dosierung nicht den erwarteten Effekt.

6. Summary

The influence of intravenous vs. intraperitoneal application of emodin and BTB 14431 on advanced intra- and extraperitoneal tumor growth in rats

For the treatment of colorectal cancer many new products are on the market, but often with drug resistance and side effects. Looking for new pharmacological agents with improved properties, a new substance (BTB 14431) was discovered by using the kinase inhibitor emodin and “in silico screening”. It was already examined once in vivo in a tumor suspension model in a previous experiment. Various studies have shown that emodin induces apoptosis, inhibits cell proliferation and suppresses angiogenesis and so may reduce tumor growth. In this experimental study the effect of emodin and BTB 14431 on the growth of advanced tumors with relation to differences in the mode of application and the dosage has now been investigated. A standardized animal model of cancer has been established and the release of vital tumor cells by an oncotic intervention was simulated. For this purpose 100 rats (WAG-RIJ) received a sterile intraperitoneal injection of 10^5 syngenic colon adenocarcinoma cells (CC-531) by laparotomy. In addition, the animals were given a subcutaneous injection of also 10^5 syngenic tumor cells of the same cell type, which should simulate peripheral metastases. To investigate the systemic influence of the newly identified substance BTB 14431 and of emodin to solid tumors half of the animals were treated by ports in the external jugular vein over a week in a 12-hour rhythm 28 days after cellapplication (control group: treatment with Ringer’s solution, treatment groups: treatment with 0,3 mg/kg bw BTB 14431, 1,7 mg/kg bw BTB 14431, emodin 2,5 mg/kg bw or emodin 5 mg/kg bw). The other half of the animals received intraperitoneal injections of the intermittent therapy. Three weeks after treatment, the animals were euthanized and the tumor weights were determined.

As a result of this experiment, a dose-dependent effect of emodin and BTB 14431 on the growth of tumors could be shown. Moreover, emodin seems to be more potent and better tolerated than BTB 14431. However, this is dependent on both the dose and the mode of application. The best results were shown in the groups with intravenous emodin treatment in one of the dosages or BTB 14431 0,3 mg/kg. The animals in this group increased more in weight and the tumors had a lower weight than in the control group. Furthermore, a better efficacy of treatment for intravenous application was observed in the mentioned groups as compared to the intraperitoneal application. In the groups with animals treated intraperitoneally there was only a difference in the weight of the tumor mass compared to the control group treated with 5 mg/kg KG emodin. BTB 14431 did not show the expected effect at higher doses.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die chemische Struktur von Emodin, Aloe-Emodin, Rhein & BTB 14431 (modifiziert nach Füllbeck et al. 2005 [55])	7
Abb. 2: Der Einfluss des CSN und seiner Kinasen auf die VEGF-induzierte Angiogenese: Wird die Phosphorylierung gehemmt kommt es zur Inhibierung der Angiogenese. (Ub = Ubiquitin; P = Phosphatgruppe; CK2 = Casein Kinase 2, PKD = Proteinkinase D) (modifiziert nach Braumann et al. 2008 [15]).....	13
Abb. 3: Kolorektale Tumorigenese (modifiziert nach Mishra et al. 2005 [122]).....	19
Abb. 4: Studiendesign schematisch (t = Zeit in Wochen).....	23
Abb. 5: Die Portimplantation Bild a: Darstellen der V. jugularis externa. Bild b: Fixation der V. jugularis externa. Bild c: Einführen des Katheters mit Hilfe des Introducers. Bild d: Ligierter Portkatheter	26
Abb. 6: Das Gesamttumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intravenöser Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.	30
Abb. 7: Das abdominale Tumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intravenöser Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.	31
Abb. 8: Das subkutane Tumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intravenöser Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.	32
Abb. 9: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapiebeginn und Obduktion.	33
Abb. 10: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapiebeginn und Therapieende.....	34
Abb. 11: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapieende und Obduktion.	35
Abb. 12: Das Gesamttumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intraperitonealer Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.	36
Abb. 13: Das abdominale Tumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intraperitonealer Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.	37
Abb. 14: Das subkutane Tumorgewicht (g) nach zweimal täglicher intraperitonealer Applikation von BTB 14431 bzw. Emodin über den Therapiezeitraum von einer Woche.	38
Abb. 15: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapiebeginn und Obduktion.	39
Abb. 16: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapiebeginn und Therapieende.....	40
Abb. 17: Die relative Körpergewichtsveränderung zwischen Therapieende und Obduktion.	41
Abb. 18: Gegenüberstellung der Gesamttumorgewichte (g) nach zweimal täglicher intraperitonealer bzw. intravenöser Applikation.....	44
Abb. 19: Gegenüberstellung der Gesamttumorgewichte (g) nach zweimal täglicher intraperitonealer bzw. intravenöser Applikation.....	45
Abb. 20: Gegenüberstellung der Gesamttumorgewichte (g) nach zweimal täglicher intraperitonealer bzw. intravenöser Applikation.....	46
Abb. 21: Gegenüberstellung der relativen Gewichtsveränderungen zwischen Therapiebeginn und Obduktion bei intraperitonealer bzw. intravenöser Behandlung.	49

Abb. 22: Gegenüberstellung der relativen Gewichtsveränderungen zwischen Therapiebeginn und Therapieende bei intraperitonealer bzw. intravenöser Behandlung.....	50
Abb. 23: Gegenüberstellung der relativen Gewichtsveränderungen zwischen Therapieende und Obduktion bei intraperitonealer bzw. intravenöser Behandlung.	51
Abb. 24: Schematische Darstellung der Unterschiede zwischen einem normalen Gefäßnetz, dem abnormalen Gefäßnetz von Tumoren, dem normalisierten Gefäßnetz nach oder während antiangiogener Therapie und dem inadäquaten Gefäßnetz, das im besten Falle bei weiterer antiangiogener Therapie entsteht und weiteres Tumorwachstum verhindert. Das normale Gefäßnetz wird durch die Balance zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren aufrechterhalten und möglicherweise nicht von einer antiangiogenen Therapie beeinflusst. Die abnormale Struktur eines Tumorgefäßnetzes ist gekennzeichnet durch unreife Gefäße mit erhöhter Permeabilität, erhöhtem interstitiellen Druck, erhöhtem Gefäßdurchmesser sowie durch eine erhöhte Gefäßlänge und verstärkte Windung der Gefäße, wodurch die Diffusion von Therapeutika und Nährstoffen in das Gewebe erschwert wird (modifiziert nach Jain et al. 2001 [79]).....	59

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) von Emodin und BTB 14431	15
Tab. 2: Faktoren, die das Risiko, an Kolorektalem Karzinom zu erkranken, erhöhen oder verringern. NEM = Nahrungsergänzungsmittel; LM = Lebensmittel (Modifiziert nach WCRF/AICR [148])	17
Tab. 3: Randomisierung der Tiere in die jeweiligen Therapiegruppen	24
Tab. 4: Außerordentliche Todesfälle; Td1- Td7: Therapietag 1 - 7; Portimplantation am Therapietag 1; iv = intravenös, ip = intraperitoneal Todesursachen: Gruppe IV: ein Tier starb während der Injektion an Therapietag 6: Herz-Kreislaufversagen, zwei Tiere wurden tot im Käfig aufgefunden; Gruppe V: ein Tier starb während der Portimplantation an Herz-Kreislaufversagen; Gruppe VI, Gruppe VII, Gruppe VIII: diese Tiere wurden tot im Käfig aufgefunden.	29
Tab. 5: Vergleich des Gesamtumorgewichts (g) der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90 %-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.	30
Tab. 6: Vergleich des abdominalen Tumorgewichts der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.	31
Tab. 7: Vergleich des subkutanen Tumorgewichts der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.	32
Tab. 8: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen zwischen Therapiebeginn und Obduktion mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.	33
Tab. 9: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen im Therapiezeitraum mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.....	34
Tab. 10: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen im Anschluss an die Therapie mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.	35
Tab. 11: Vergleich des Gesamtumorgewichts der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die exakte Signifikanz.	36
Tab. 12: Vergleich des intraperitonealen Tumorgewichts der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.	37
Tab. 13: Vergleich des subkutanen Tumorgewichts der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.	38

Tab. 14: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen zwischen Therapiebeginn und Obduktion mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.	39
Tab. 15: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen im Therapiezeitraum mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die Signifikanz.....	40
Tab. 16: Vergleich der relativen Änderung des Körpergewichts der Tiere der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen im Anschluss an die Therapie mittels Mann-Whitney-U-Test: angegeben ist der Median, in Klammern das 90%-Konfidenzintervall des Mittelwertes sowie die exakte Signifikanz.	41
Tab. 17: Gegenüberstellung aller Tumorgewichte; TG Gesamt - Gesamttumorgewicht; abd TG - abdominales Tumorgewicht; sc TG - subkutanes Tumorgewicht	42
Tab. 18: Verglichen wurden die Tumorgewichte der einzelnen Therapiegruppen zwischen intravenöser (iv) und intraperitonealer (ip) Applikationsform mittels Mann-Whitney-U-Test.....	43
Tab. 19: Gegenüberstellung der Gewichtsentwicklung; rel. Änd. d1T – obd: relative Änderung des Körpergewichts zwischen Therapiebeginn und Obduktion; rel. Änd. d1T – d7T: relative Änderung des Körpergewichts im Therapiezeitraum; rel. Änd. d7T – obd: relative Änderung des Körpergewichts im Anschluss an die Therapie	47
Tab. 20: Verglichen wurden die relativen Gewichtsveränderungen der einzelnen Therapiegruppen zwischen intravenöser und intraperitonealer Applikationsform mittels Mann-Whitney-U-Test.	47

9. Literatur

- 1 Acevedo-Duncan M.; Russell C.; Patel S.; Patel R. (2004):
Aloe-emodin modulates PKC isozymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells.
International Immunopharmacology. 4(14),S.1775-84.
- 2 Agency European Medicines (2013):
"EPAR summary for the public: Zaltrap (Aflibercept)."
European Medicines Agency, 2013.
- 3 Aggarwal B. B.; Gehlot P. (2009):
Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients?
Current Opinion in Pharmacology. 9(4),S.351-69.
- 4 Albin A.; Tosetti F.; Benelli R.; Noonan D. M. (2005):
Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention.
Cancer Research. 65(23),S.10637-41.
- 5 Albrecht Ulrike (2008):
Anti-angiogenetische Therapie beim humanen Pankreaskarzinom durch CXCR2-Inhibition im orthotopen Nacktmausmodell. Dissertation, LMU München.
- 6 Allavena P.; Garlanda C.; Borrello M. G.; Sica A.; Mantovani A. (2008):
Pathways connecting inflammation and cancer.
Current Opinion in Genetics and Development. 18(1),S.3-10.
- 7 Alon T.; Hemo I.; Itin A.; Pe'er J.; Stone J., et al. (1995):
Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity.
Nature Medicine. 1(10),S.1024-8.
- 8 Augustin H. G. (2005):
Angiogenesis in the female reproductive system.
Experientia(94),S.35-52.
- 9 Augustin Hellmut G; Christian Sven (2010):
Angiogenese.
In: Die Onkologie. / Hrsg. W. Hiddemann and C. R. Bartram Springer Berlin Heidelberg.
ISBN:978-3-540-79724-1. S.291-307.)
- 10 Baish J. W.; Jain R. K. (2000):
Fractals and cancer.
Cancer Research. 60(14),S.3683-8.
- 11 Bech-Otschir D.; Kraft R.; Huang X.; Henklein P.; Kapelari B., et al. (2001):
COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system.
EMBO Journal. 20(7),S.1630-9.
- 12 Bergers G.; Benjamin L. E. (2003):
Tumorigenesis and the angiogenic switch.
Nature Reviews. Cancer. 3(6),S.401-10.
- 13 Bheda A.; Creek K. E.; Pirisi L. (2008):
Loss of p53 induces epidermal growth factor receptor promoter activity in normal human keratinocytes.
Oncogene. 27(31),S.4315-23.
- 14 Black W. C.; Welch H. G. (1993):
Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy.
New England Journal of Medicine. 328(17),S.1237-43.
- 15 Braumann C.; Tangermann J.; Jacobi C. A.; Müller J. M.; Dubiel W. (2008):
Novel anti-angiogenic compounds for application in tumor therapy - COP9 signalosome-associated kinases as possible targets.
Mini Reviews in Medicinal Chemistry. 8(5),S.421-8.
- 16 Brawer M. K. (1996):
Quantitative microvessel density. A staging and prognostic marker for human prostatic carcinoma.
Cancer. 78(2),S.345-9.
- 17 Cadigan K. M.; Liu Y. I. (2006):
Wnt signaling: complexity at the surface.
Journal of Cell Science. 119(Pt 3),S.395-402.

- 18 Cai Y.; Sun M.; Xing J.; Corke H. (2004):
Antioxidant phenolic constituents in roots of Rheum officinale and Rubia cordifolia: structure-radical scavenging activity relationships.
Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(26),S.7884-90.
- 19 Carmeliet P.; Jain R. K. (2000):
Angiogenesis in cancer and other diseases.
Nature. 407(6801),S.249-57.
- 20 Casanovas O.; Hicklin D. J.; Bergers G.; Hanahan D. (2005):
Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors.
Cancer Cell. 8(4),S.299-309.
- 21 Cha T. L.; Qiu L.; Chen C. T.; Wen Y.; Hung M. C. (2005):
Emodin down-regulates androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth.
Cancer Research. 65(6),S.2287-95.
- 22 Chan T. C.; Chang C. J.; Koonchanok N. M.; Geahlen R. L. (1993):
Selective inhibition of the growth of ras-transformed human bronchial epithelial cells by emodin, a protein-tyrosine kinase inhibitor.
Biochemical and Biophysical Research Communications. 193(3),S.1152-8.
- 23 Chang C. J.; Ashendel C. L.; Geahlen R. L.; McLaughlin J. L.; Waters D. J. (1996):
Oncogene signal transduction inhibitors from medicinal plants.
In Vivo. 10(2),S.185-90.
- 24 Chen H. C.; Hsieh W. T.; Chang W. C.; Chung J. G. (2004):
Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells.
Food and Chemical Toxicology. 42(8),S.1251-7.
- 25 Chen H.; Yuan Y.; Zhang C.; Luo A.; Ding F., et al. (2012):
Involvement of S100A14 protein in cell invasion by affecting expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-2 via p53-dependent transcriptional regulation.
Journal of Biological Chemistry. 287(21),S.17109-19.
- 26 Chen Y. C.; Shen S. C.; Lee W. R.; Hsu F. L.; Lin H. Y., et al. (2002):
Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production.
Biochemical Pharmacology. 64(12),S.1713-24.
- 27 Chinenov Y.; Kerppola T. K. (2001):
Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity.
Oncogene. 20(19),S.2438-52.
- 28 Chun-Guang W.; Jun-Qing Y.; Bei-Zhong L.; Dan-Ting J.; Chong W., et al. (2010):
Anti-tumor activity of emodin against human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines in vitro and in vivo.
European Journal of Pharmacology. 627(1-3),S.33-41.
- 29 Ciechanover A.; Ben-Saadon R. (2004):
N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in.
Trends in Cell Biology. 14(3),S.103-6.
- 30 Clauss M.; Gerlach M.; Gerlach H.; Brett J.; Wang F., et al. (1990):
Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration.
Journal of Experimental Medicine. 172(6),S.1535-45.
- 31 Cohen M.; Wuillemin C.; Irion O.; Bischof P. (2008):
Regulation of MMP-9 by p53 in first trimester cytotrophoblastic cells.
Human Reproduction. 23(10),S.2273-81.
- 32 Cuellar M. J.; Giner R. M.; Recio M. C.; Manez S.; Rios J. L. (2001):
Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders.
Fitoterapia. 72(3),S.221-9.
- 33 Damodharan U.; Ganesan R.; Radhakrishnan U. C. (2011):
Expression of MMP2 and MMP9 (gelatinases A and B) in human colon cancer cells.
Applied Biochemistry and Biotechnology. 165(5-6),S.1245-52.
- 34 Davies J. W.; Glick M.; Jenkins J. L. (2006):
Streamlining lead discovery by aligning in silico and high-throughput screening.
Current Opinion in Chemical Biology. 10(4),S.343-51.

- 35 de Jong G. M.; Bleichrodt R. P.; Eek A.; Oyen W. J.; Boerman O. C., *et al.* (2010):
Experimental study of radioimmunotherapy versus chemotherapy for colorectal cancer.
British Journal of Surgery.
- 36 de Kant E.; Heide I.; Thiede C.; Herrmann R.; Rochlitz C. F. (1996):
MDR1 expression correlates with mutant p53 expression in colorectal cancer metastases.
Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 122(11),S.671-5.
- 37 De Spiegelaere W.; Casteleyn C.; Van den Broeck W.; Plendl J.; Bahramsoltani M., *et al.*
(2012):
Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis.
Journal of Vascular Research. 49(5),S.390-404.
- 38 Deane N. G.; Parker M. A.; Beauchamp R. D. (2005):
Cell proliferation: a matter of time and place.
Surgery. 138(1),S.1-7.
- 39 Djonov V.; Baum O.; Burri P. H. (2003):
Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis.
Cell and Tissue Research. 314(1),S.107-17.
- 40 Eferl R.; Wagner E. F. (2003):
AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis.
Nature Reviews. Cancer. 3(11),S.859-68.
- 41 Ekins S.; Mestres J.; Testa B. (2007):
In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling.
British Journal of Pharmacology. 152(1),S.9-20.
- 42 Fearon E. R.; Vogelstein B. (1990):
A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell. 61(5),S.759-67.
- 43 Ferlay J Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM (2008):
GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10.
Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from:
<http://globocan.iarc.fr>, accessed on 10/04/2013.
- 44 Ferrara N. (2004):
Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy.
Oncologist. 9 Suppl 1,S.2-10.
- 45 Ferrara N.; Gerber H. P.; LeCouter J. (2003):
The biology of VEGF and its receptors.
Nature Medicine. 9(6),S.669-76.
- 46 Ferrara N.; Henzel W. J. (1989):
Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.
Biochemical and Biophysical Research Communications. 161(2),S.851-8.
- 47 Fidler I. J. (2003):
The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.
Nature Reviews. Cancer. 3(6),S.453-8.
- 48 Folkman J. (1971):
Tumor angiogenesis: therapeutic implications.
New England Journal of Medicine. 285(21),S.1182-6.
- 49 Folkman J. (1972):
Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors.
Annals of Surgery. 175(3),S.409-16.
- 50 Folkman J. (2003):
Angiogenesis and apoptosis.
Seminars in Cancer Biology. 13(2),S.159-67.
- 51 Folkman J. (2003):
Fundamental concepts of the angiogenic process.
Current Molecular Medicine. 3(7),S.643-51.
- 52 Folkman J. (2006):
Angiogenesis.
Annual Review of Medicine. 57,S.1-18.
- 53 Folkman J.; Kalluri R. (2004):
Cancer without disease.
Nature. 427(6977),S.787.

- 54 Freeman M. R.; Solomon K. R. (2004):
Cholesterol and prostate cancer.
Journal of Cellular Biochemistry. 91(1),S.54-69.
- 55 Fullbeck M.; Huang X.; Dumdey R.; Frommel C.; Dubiel W., et al. (2005):
Novel curcumin- and emodin-related compounds identified by in silico 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells.
BMC Cancer. 5,S.97.
- 56 Gerber H. P.; McMurtrey A.; Kowalski J.; Yan M.; Keyt B. A., et al. (1998):
Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation.
Journal of Biological Chemistry. 273(46),S.30336-43.
- 57 Gesellschaft Robert Koch-Institut und die; Berlin der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2012):
Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Auflage.
- 58 Geva R.; Vecchione L.; Tejpar S.; Piessevaux H.; Van Cutsem E., et al. (2013):
Bevacizumab plus chemotherapy as salvage treatment in chemorefractory patients with metastatic colorectal cancer.
Onco Targets Ther. 6,S.53-8.
- 59 Glade Bender J.; Cooney E. M.; Kandel J. J.; Yamashiro D. J. (2004):
Vascular remodeling and clinical resistance to antiangiogenic cancer therapy.
Drug Resistance Updates. 7(4-5),S.289-300.
- 60 Goh A. M.; Coffill C. R.; Lane D. P. (2011):
The role of mutant p53 in human cancer.
Journal of Pathology. 223(2),S.116-26.
- 61 Gottlieb T. M.; Oren M. (1998):
p53 and apoptosis.
Seminars in Cancer Biology. 8(5),S.359-68.
- 62 Guo H. C.; Bu H. Q.; Luo J.; Wei W. T.; Liu D. L., et al. (2012):
Emodin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in PANC-1 pancreatic cancer xenograft model in vivo via inhibition of inhibitors of apoptosis.
International Journal of Oncology. 40(6),S.1849-57.
- 63 Haberland J. Wolf U., Banres B., Bertz J., Dahm S., Laudi A., Krywinkel K. (2012):
German short-term cancer mortality predictions up until 2015.
UMID. 3,S.8.
- 64 He Z. H.; He M. F.; Ma S. C.; But P. P. (2009):
Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives.
Journal of Ethnopharmacology. 121(2),S.313-7.
- 65 Heinen C. D. (2010):
Genotype to phenotype: analyzing the effects of inherited mutations in colorectal cancer families.
Mutation Research. 693(1-2),S.32-45.
- 66 Henke W.; Ferrell K.; Bech-Otschir D.; Seeger M.; Schade R., et al. (1999):
Comparison of human COP9 signalsome and 26S proteasome lid'.
Molecular Biology Reports. 26(1-2),S.29-34.
- 67 Hershko A.; Ciechanover A. (1998):
The ubiquitin system.
Annual Review of Biochemistry. 67,S.425-79.
- 68 Hlatky L.; Hahnfeldt P.; Folkman J. (2002):
Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us.
Journal of the National Cancer Institute. 94(12),S.883-93.
- 69 Hofelder M.; Nowak-Gottl U.; Wolff J. E. (1997):
Tumorangiogenesis: a network of cytokines.
Klinische Padiatrie. 209(4),S.265-70.
- 70 Huang Q.; Lu G.; Shen H. M.; Chung M. C.; Ong C. N. (2007):
Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb.
Medicinal Research Reviews. 27(5),S.609-30.

- 71 Huang Q.; Shen H. M.; Ong C. N. (2004):
Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB.
Biochemical Pharmacology. 68(2),S.361-71.
- 72 Huang Q.; Shen H. M.; Ong C. N. (2005):
Emodin inhibits tumor cell migration through suppression of the phosphatidylinositol 3-kinase-Cdc42/Rac1 pathway.
Cellular and Molecular Life Sciences. 62(10),S.1167-75.
- 73 Huang Q.; Shen H. M.; Shui G.; Wenk M. R.; Ong C. N. (2006):
Emodin inhibits tumor cell adhesion through disruption of the membrane lipid Raft-associated integrin signaling pathway.
Cancer Research. 66(11),S.5807-15.
- 74 Humphrey S.; Walsh N. M.; Delaney L.; Propperova I.; Langley R. G. (2006):
Prognostic significance of vascularity in cutaneous melanoma: pilot study using in vivo confocal scanning laser microscopy.
Journal of Cutaneous Medicine and Surgery. 10(3),S.122-7.
- 75 Hurwitz H.; Fehrenbacher L.; Novotny W.; Cartwright T.; Hainsworth J., et al. (2004):
Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.
New England Journal of Medicine. 350(23),S.2335-42.
- 76 Huxley R. R.; Ansary-Moghaddam A.; Clifton P.; Czernichow S.; Parr C. L., et al. (2009):
The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence.
International Journal of Cancer. 125(1),S.171-80.
- 77 Inoue K.; Kurabayashi A.; Shuin T.; Ohtsuki Y.; Furihata M. (2012):
Overexpression of p53 protein in human tumors.
Medical Molecular Morphology. 45(3),S.115-23.
- 78 Jain R. K. (1998):
The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics.
Nature Medicine. 4(6),S.655-7.
- 79 Jain R. K. (2001):
Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy.
Nature Medicine. 7(9),S.987-9.
- 80 Jain R. K. (2002):
Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor.
Seminars in Oncology. 29(6 Suppl 16),S.3-9.
- 81 Jain R. K.; Safabakhsh N.; Sckell A.; Chen Y.; Jiang P., et al. (1998):
Endothelial cell death, angiogenesis, and microvascular function after castration in an androgen-dependent tumor: role of vascular endothelial growth factor.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95(18),S.10820-5.
- 82 Jing X.; Ueki N.; Cheng J.; Imanishi H.; Hada T. (2002):
Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines by emodin.
Japanese Journal of Cancer Research. 93(8),S.874-82.
- 83 Johnson I. T.; Lund E. K. (2007):
Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer.
Alimentary Pharmacology and Therapeutics. 26(2),S.161-81.
- 84 Kamei H.; Koide T.; Kojima T.; Hashimoto Y.; Hasegawa M. (1998):
Inhibition of cell growth in culture by quinones.
Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. 13(3),S.185-8.
- 85 Kaneshiro T.; Morioka T.; Inamine M.; Kinjo T.; Arakaki J., et al. (2006):
Anthraquinone derivative emodin inhibits tumor-associated angiogenesis through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation.
Eur J Pharmacol. 553(1-3),S.46-53.
- 86 Kashani-Sabet M.; Sagebiel R. W.; Ferreira C. M.; Nosrati M.; Miller J. R., 3rd (2002):
Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma.
Journal of Clinical Oncology. 20(7),S.1826-31.

- 87 Kawai K.; Kato T.; Mori H.; Kitamura J.; Nozawa Y. (1984):
A comparative study on cytotoxicities and biochemical properties of anthraquinone mycotoxins emodin and skyrin from Penicillium islandicum Sopp.
Toxicology Letters. 20(2),S.155-60.
- 88 Kerbel R. S. (2005):
Therapeutic implications of intrinsic or induced angiogenic growth factor redundancy in tumors revealed.
Cancer Cell. 8(4),S.269-71.
- 89 Kim M. S.; Park M. J.; Kim S. J.; Lee C. H.; Yoo H., et al. (2005):
Emodin suppresses hyaluronic acid-induced MMP-9 secretion and invasion of glioma cells.
International Journal of Oncology. 27(3),S.839-46.
- 90 Klaver Y. L.; Hendriks T.; Lomme R. M.; Rutten H. J.; Bleichrodt R. P., et al. (2012):
Intraoperative versus early postoperative intraperitoneal chemotherapy after cytoreduction for colorectal peritoneal carcinomatosis: an experimental study.
Annals of Surgical Oncology. 19 Suppl 3,S.S475-82.
- 91 Knighton D. R.; Hunt T. K.; Thakral K. K.; Goodson W. H., 3rd (1982):
Role of platelets and fibrin in the healing sequence: an in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis.
Annals of Surgery. 196(4),S.379-88.
- 92 Krneta J.; Kroll J.; Alves F.; Prahst C.; Sananbenesi F., et al. (2006):
Dissociation of angiogenesis and tumorigenesis in follistatin- and activin-expressing tumors.
Cancer Research. 66(11),S.5686-95.
- 93 Kumar A.; Dhawan S.; Aggarwal B. B. (1998):
Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, IkappaB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells.
Oncogene. 17(7),S.913-8.
- 94 Kuo P. L.; Lin T. C.; Lin C. C. (2002):
The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines.
Life Sciences. 71(16),S.1879-92.
- 95 Kuo Y. C.; Sun C. M.; Ou J. C.; Tsai W. J. (1997):
A tumor cell growth inhibitor from Polygonum hypoleucum Ohwi.
Life Sciences. 61(23),S.2335-44.
- 96 Kupchan S. M.; Karim A. (1976):
Tumor inhibitors. 114. Aloe emodin: antileukemic principle isolated from Rhamnus frangula L.
Lloydia. 39(4),S.223-4.
- 97 Kwak H. J.; Park M. J.; Park C. M.; Moon S. I.; Yoo D. H., et al. (2006):
Emodin inhibits vascular endothelial growth factor-A-induced angiogenesis by blocking receptor-2 (KDR/Flk-1) phosphorylation.
International Journal of Cancer. 118(11),S.2711-20.
- 98 Lai G. H.; Zhang Z.; Sirica A. E. (2003):
Celecoxib acts in a cyclooxygenase-2-independent manner and in synergy with emodin to suppress rat cholangiocarcinoma growth in vitro through a mechanism involving enhanced Akt inactivation and increased activation of caspases-9 and -3.
Molecular Cancer Therapeutics. 2(3),S.265-71.
- 99 Lane D. P. (1992):
Cancer. p53, guardian of the genome.
Nature. 358(6381),S.15-6.
- 100 Lee C. G.; Heijn M.; di Tomaso E.; Griffon-Etienne G.; Ancukiewicz M., et al. (2000):
Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions.
Cancer Research. 60(19),S.5565-70.
- 101 Lee E.; Salic A.; Kruger R.; Heinrich R.; Kirschner M. W. (2003):
The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway.
PLoS Biology. 1(1),S.E10.

- 102 Lee H. Z.; Hsu S. L.; Liu M. C.; Wu C. H. (2001):
Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma.
European Journal of Pharmacology. 431(3),S.287-95.
- 103 Lee J.; Jung E.; Huh S.; Hwang C. H.; Lee H. Y., *et al.* (2006):
Emodin inhibits TNF alpha-induced MMP-1 expression through suppression of activator protein-1 (AP-1).
Life Sci. 79(26),S.2480-5.
- 104 Levin Peter Boyle and Bernard, (2008):
World Cancer Report
International Agency for Research on Cancer
- 105 Levine A. J. (1997):
p53, the cellular gatekeeper for growth and division.
Cell. 88(3),S.323-31.
- 106 Li X. X.; Dong Y.; Wang W.; Wang H. L.; Chen Y. Y., *et al.* (2013):
Emodin as an effective agent in targeting cancer stem-like side population cells of gallbladder carcinoma.
Stem Cells and Development. 22(4),S.554-66.
- 107 Lin M. L.; Lu Y. C.; Chung J. G.; Li Y. C.; Wang S. G., *et al.* (2010):
Aloe-emodin induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via caspase-8-mediated activation of the mitochondrial death pathway.
Cancer Letters. 291(1),S.46-58.
- 108 Lin S. Z.; Wei W. T.; Chen H.; Chen K. J.; Tong H. F., *et al.* (2012):
Antitumor activity of emodin against pancreatic cancer depends on its dual role: promotion of apoptosis and suppression of angiogenesis.
PLoS ONE. 7(8),S.e42146.
- 109 Liu A.; Chen H.; Tong H.; Ye S.; Qiu M., *et al.* (2011):
Emodin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in pancreatic cancer cells via inhibition of nuclear factor-kappaB.
Mol Med Rep. 4(2),S.221-7.
- 110 Liu D. L.; Bu H.; Li H.; Chen H.; Guo H. C., *et al.* (2012):
Emodin reverses gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells via the mitochondrial apoptosis pathway in vitro.
International Journal of Oncology. 40(4),S.1049-57.
- 111 Liu R.; Hsieh C. Y.; Lam K. S. (2004):
New approaches in identifying drugs to inactivate oncogene products.
Seminars in Cancer Biology. 14(1),S.13-21.
- 112 Ljubimov A. V.; Caballero S.; Aoki A. M.; Pinna L. A.; Grant M. B., *et al.* (2004):
Involvement of protein kinase CK2 in angiogenesis and retinal neovascularization.
Investigative Ophthalmology and Visual Science. 45(12),S.4583-91.
- 113 Lopez-Graniel C. M.; Tamez de Leon D.; Meneses-Garcia A.; Gomez-Ruiz C.; Frias-Mendivil M., *et al.* (2001):
Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity carcinomas.
Journal of Experimental and Clinical Cancer Research. 20(4),S.463-8.
- 114 Lu Y.; Zhang J.; Qian J. (2008):
The effect of emodin on VEGF receptors in human colon cancer cells.
Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals. 23(2),S.222-8.
- 115 Ma Y. S.; Weng S. W.; Lin M. W.; Lu C. C.; Chiang J. H., *et al.* (2012):
Antitumor effects of emodin on LS1034 human colon cancer cells in vitro and in vivo: roles of apoptotic cell death and LS1034 tumor xenografts model.
Food and Chemical Toxicology. 50(5),S.1271-8.
- 116 Marreiros A.; Dudgeon K.; Dao V.; Grimm M. O.; Czolij R., *et al.* (2005):
KAI1 promoter activity is dependent on p53, junB and AP2: evidence for a possible mechanism underlying loss of KAI1 expression in cancer cells.
Oncogene. 24(4),S.637-49.
- 117 Matsumoto M.; Nishinakagawa H.; Kurohmaru M.; Hayashi Y.; Otsuka J. (1992):
Pregnancy and lactation affect the microvasculature of the mammary gland in mice.
Journal of Veterinary Medical Science. 54(5),S.937-43.

- 118 Matthews C. P.; Colburn N. H.; Young M. R. (2007):
AP-1 a target for cancer prevention.
Current Cancer Drug Targets. 7(4),S.317-24.
- 119 Maya R.; Balass M.; Kim S. T.; Shkedy D.; Leal J. F., *et al.* (2001):
ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage.
Genes and Development. 15(9),S.1067-77.
- 120 Meng X.; Riordan N. H.; Riordan H. D.; Mikirova N.; Jackson J., *et al.* (2004):
Cell membrane fatty acid composition differs between normal and malignant cell lines.
Puerto Rico Health Sciences Journal. 23(2),S.103-6.
- 121 Mignatti P.; Rifkin D. B. (1996):
Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis.
Enzyme and Protein. 49(1-3),S.117-37.
- 122 Mishra L.; Shetty K.; Tang Y.; Stuart A.; Byers S. W. (2005):
The role of TGF-beta and Wnt signaling in gastrointestinal stem cells and cancer.
Oncogene. 24(37),S.5775-89.
- 123 Modlich U.; Kaup F. J.; Augustin H. G. (1996):
Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion.
Laboratory Investigation. 74(4),S.771-80.
- 124 Mohanty S.; Adhikary A.; Chakrabarty S.; Sa G.; Das T. (2012):
Operation 'p53 Hunt' to combat cancer: theaflavins in action.
Front Biosci (Schol Ed). 4,S.300-20.
- 125 Morin P. J.; Sparks A. B.; Korinek V.; Barker N.; Clevers H., *et al.* (1997):
Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC.
Science. 275(5307),S.1787-90.
- 126 Morson B. (1974):
President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel.
Proceedings of the Royal Society of Medicine. 67(6 Pt 1),S.451-7.
- 127 Moserle L.; Amadori A.; Indraccolo S. (2009):
The angiogenic switch: implications in the regulation of tumor dormancy.
Current Molecular Medicine. 9(8),S.935-41.
- 128 Nagy J. A.; Masse E. M.; Herzberg K. T.; Meyers M. S.; Yeo K. T., *et al.* (1995):
Pathogenesis of ascites tumor growth: vascular permeability factor, vascular hyperpermeability, and ascites fluid accumulation.
Cancer Research. 55(2),S.360-8.
- 129 National Toxicology Program (2001):
NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of EMODIN (CAS NO. 518-82-1) Feed Studies in F344/N Rats and B6C3F1 Mice.
Natl Toxicol Program Tech Rep Ser. 493,S.1-278.
- 130 Naumann M.; Bech-Otschir D.; Huang X.; Ferrell K.; Dubiel W. (1999):
COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK.
Journal of Biological Chemistry. 274(50),S.35297-300.
- 131 Naumov G. N.; Akslen L. A.; Folkman J. (2006):
Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch.
Cell Cycle. 5(16),S.1779-87.
- 132 O'Connell J. B.; Maggard M. A.; Ko C. Y. (2004):
Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging.
Journal of the National Cancer Institute. 96(19),S.1420-5.
- 133 Oda E.; Ohki R.; Murasawa H.; Nemoto J.; Shibue T., *et al.* (2000):
Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis.
Science. 288(5468),S.1053-8.
- 134 Olsson A. K.; Dimberg A.; Kreuger J.; Claesson-Welsh L. (2006):
VEGF receptor signalling - in control of vascular function.
Nature Reviews. Molecular Cell Biology. 7(5),S.359-71.
- 135 Olsten M. E.; Litchfield D. W. (2004):
Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2.
Biochemistry and Cell Biology. 82(6),S.681-93.

- 136 Park Y.; Hunter D. J.; Spiegelman D.; Bergkvist L.; Berrino F., *et al.* (2005):
Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies.
Journal of the American Medical Association. 294(22),S.2849-57.
- 137 Parker L. H.; Schmidt M.; Jin S. W.; Gray A. M.; Beis D., *et al.* (2004):
The endothelial-cell-derived secreted factor Egif7 regulates vascular tube formation.
Nature. 428(6984),S.754-8.
- 138 Pecere T.; Sarinella F.; Salata C.; Gatto B.; Bet A., *et al.* (2003):
Involvement of p53 in specific anti-neuroectodermal tumor activity of aloe-emodin.
International Journal of Cancer. 106(6),S.836-47.
- 139 Peth A.; Berndt C.; Henke W.; Dubiel W. (2007):
Downregulation of COP9 signalosome subunits differentially affects the CSN complex and target protein stability.
BioMed Central Biochemistry. 8,S.27.
- 140 Pickart C. M.; Eddins M. J. (2004):
Ubiquitin: structures, functions, mechanisms.
Biochimica et Biophysica Acta. 1695(1-3),S.55-72.
- 141 Pohlen U.; Reszka R.; Buhr H. J.; Berger G. (2011):
Hepatic arterial infusion in the treatment of liver metastases with PEG liposomes in combination with degradable starch microspheres (DSM) increases tumor 5-FU concentration. an animal study in CC-531 liver tumor-bearing rats.
Anticancer Research. 31(1),S.147-52.
- 142 Pohlenz J. (2010):
Der Einfluss der intraperitonealen und intravenösen Applikation von Emodin und BTB14431 in der konventionellen Chirurgie auf das intra- und extraperitoneale Tumorwachstum bei Ratten. Dissertation, FU Berlin.
- 143 Popadic D.; Savic E.; Ramic Z.; Djordjevic V.; Trajkovic V., *et al.* (2012):
Aloe-emodin inhibits proliferation of adult human keratinocytes in vitro.
Journal of Cosmetic Science. 63(5),S.297-302.
- 144 Pouyssegur J.; Dayan F.; Mazure N. M. (2006):
Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression.
Nature. 441(7092),S.437-43.
- 145 Pox C.; Aretz S. ; Bischoff S.C.; Graeven U.; Hass M., *et al.* (2013):
Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 021-007OL.
- 146 Pretlow T. P. (1995):
Aberrant crypt foci and K-ras mutations: earliest recognized players or innocent bystanders in colon carcinogenesis?
Gastroenterology. 108(2),S.600-3.
- 147 Relf M.; LeJeune S.; Scott P. A.; Fox S.; Smith K., *et al.* (1997):
Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis.
Cancer Research. 57(5),S.963-9.
- 148 Research World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer (2007):
Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective.
Washington DC: AICR.
- 149 Rozengurt E.; Rey O.; Waldron R. T. (2005):
Protein kinase D signaling.
Journal of Biological Chemistry. 280(14),S.13205-8.
- 150 Ruoslahti E. (2002):
Specialization of tumour vasculature.
Nature Reviews. Cancer. 2(2),S.83-90.
- 151 Saltz L. B.; Clarke S.; Diaz-Rubio E.; Scheithauer W.; Figer A., *et al.* (2008):
Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study.
Journal of Clinical Oncology. 26(12),S.2013-9.
- 152 Sansone P.; Bromberg J. (2011):
Environment, inflammation, and cancer.
Curr Opin Genet Dev. 21(1),S.80-5.

- 153 Sarno S.; Moro S.; Meggio F.; Zagotto G.; Dal Ben D., *et al.* (2002):
Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors.
Pharmacology and Therapeutics. 93(2-3),S.159-68.
- 154 Schölmerich J. (2005):
Leitfaden kolorektales Karzinom.(2.),S.19.
- 155 Senger D. R.; Galli S. J.; Dvorak A. M.; Perruzzi C. A.; Harvey V. S., *et al.* (1983):
Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.
Science. 219(4587),S.983-5.
- 156 Shaulian E.; Karin M. (2002):
AP-1 as a regulator of cell life and death.
Nature Cell Biology. 4(5),S.131-6.
- 157 Shieh D. E.; Chen Y. Y.; Yen M. H.; Chiang L. C.; Lin C. C. (2004):
Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells.
Life Sciences. 74(18),S.2279-90.
- 158 Shieh S. Y.; Ikeda M.; Taya Y.; Prives C. (1997):
DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2.
Cell. 91(3),S.325-34.
- 159 Shinkaruk S.; Bayle M.; Lain G.; Deleris G. (2003):
Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy.
Curr Med Chem Anticancer Agents. 3(2),S.95-117.
- 160 Sjostrom-Mattson J.; Von Boguslawski K.; Bengtsson N. O.; Mjaaland I.; Salmenkivi K., *et al.*
(2009):
The expression of p53, bcl-2, bax, fas and fasL in the primary tumour and lymph node metastases of breast cancer.
Acta Oncologica. 48(8),S.1137-43.
- 161 Song Z. C.; Wang Z. S.; Bai J. H.; Li Z.; Hu J. (2012):
Emodin, a naturally occurring anthraquinone, ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats.
Tohoku Journal of Experimental Medicine. 227(3),S.225-30.
- 162 Sperling J.; Schafer T.; Ziemann C.; Benz-Weiber A.; Kollmar O., *et al.* (2012):
Hepatic arterial infusion of bevacizumab in combination with oxaliplatin reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases.
Clinical and Experimental Metastasis. 29(2),S.91-9.
- 163 Staton C.; Lewis C.; Bicknell R. (2006):
Angiogenesis Assays: A Critical Appraisal of Current Techniques: Wiley:ISBN:ISBN: 978-0-470-01600-8.),S.269.
- 164 Steller H. (1995):
Mechanisms and genes of cellular suicide.
Science. 267(5203),S.1445-9.
- 165 Stoeltzing O.; McCarty M. F.; Wey J. S.; Fan F.; Liu W., *et al.* (2004):
Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation.
J Natl Cancer Inst. 96(12),S.946-56.
- 166 Storti P.; Bolzoni M.; Donofrio G.; Airoidi I.; Guasco D., *et al.* (2013):
Hypoxia-inducible factor (hif)-1alpha suppression in myeloma cells blocks tumoral growth in vivo inhibiting angiogenesis and bone destruction.
Leukemia.
- 167 Su Y. T.; Chang H. L.; Shyue S. K.; Hsu S. L. (2005):
Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway.
Biochemical Pharmacology. 70(2),S.229-41.
- 168 Suboj P.; Babykutty S.; Valiyaparambil Gopi D. R.; Nair R. S.; Srinivas P., *et al.* (2012):
Aloe emodin inhibits colon cancer cell migration/angiogenesis by downregulating MMP-2/9, RhoB and VEGF via reduced DNA binding activity of NF-kappaB.
European Journal of Pharmaceutical Sciences. 45(5),S.581-91.
- 169 Thomas K. A. (1996):
Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent.
Journal of Biological Chemistry. 271(2),S.603-6.

- 170 Thome M. A.; Ehrlich D.; Koesters R.; Muller-Stich B.; Unglaub F., *et al.* (2009):
The point of conversion in laparoscopic colonic surgery affects the oncologic outcome in an experimental rat model.
Surgical Endoscopy. 23(9),S.1988-94.
- 171 Toscano F.; Fajoui Z. E.; Gay F.; Lalaoui N.; Parmentier B., *et al.* (2008):
P53-mediated upregulation of DcR1 impairs oxaliplatin/TRAIL-induced synergistic anti-tumour potential in colon cancer cells.
Oncogene. 27(30),S.4161-71.
- 172 Tsuzuki Y.; Fukumura D.; Oosthuysen B.; Koike C.; Carmeliet P., *et al.* (2000):
Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors.
Cancer Research. 60(22),S.6248-52.
- 173 Uhle S.; Medalia O.; Waldron R.; Dumdey R.; Henklein P., *et al.* (2003):
Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome.
EMBO Journal. 22(6),S.1302-12.
- 174 Unger G. M.; Davis A. T.; Slaton J. W.; Ahmed K. (2004):
Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: implications for cancer therapy.
Current Cancer Drug Targets. 4(1),S.77-84.
- 175 Vasen H. F.; Wijnen J. T.; Menko F. H.; Kleibeuker J. H.; Taal B. G., *et al.* (1996):
Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis.
Gastroenterology. 110(4),S.1020-7.
- 176 Vilorio-Petit A.; Crombet T.; Jothy S.; Hicklin D.; Bohlen P., *et al.* (2001):
Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis.
Cancer Research. 61(13),S.5090-101.
- 177 Vleugel M. M.; Greijer A. E.; Bos R.; van der Wall E.; van Diest P. J. (2006):
c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer.
Human Pathology. 37(6),S.668-74.
- 178 Vogelstein B.; Lane D.; Levine A. J. (2000):
Surfing the p53 network.
Nature. 408(6810),S.307-10.
- 179 Wagner E. F.; Eferl R. (2005):
Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system.
Immunological Reviews. 208,S.126-40.
- 180 Wang W.; Sun Y.; Li X.; Li H.; Chen Y., *et al.* (2011):
Emodin potentiates the anticancer effect of cisplatin on gallbladder cancer cells through the generation of reactive oxygen species and the inhibition of survivin expression.
Oncology Reports. 26(5),S.1143-8.
- 181 Wang X. H.; Wu S. Y.; Zhen Y. S. (2004):
Inhibitory effects of emodin on angiogenesis.
Yao Xue Xue Bao (Acta Pharmaceutica Sinica). 39(4),S.254-8.
- 182 Wang Z. H.; Chen H.; Guo H. C.; Tong H. F.; Liu J. X., *et al.* (2011):
Enhanced antitumor efficacy by the combination of emodin and gemcitabine against human pancreatic cancer cells via downregulation of the expression of XIAP in vitro and in vivo.
International Journal of Oncology. 39(5),S.1123-31.
- 183 Wei N.; Serino G.; Deng X. W. (2008):
The COP9 signalosome: more than a protease.
Trends in Biochemical Sciences. 33(12),S.592-600.
- 184 Wei W. T.; Chen H.; Ni Z. L.; Liu H. B.; Tong H. F., *et al.* (2011):
Antitumor and apoptosis-promoting properties of emodin, an anthraquinone derivative from Rheum officinale Baill, against pancreatic cancer in mice via inhibition of Akt activation.
International Journal of Oncology. 39(6),S.1381-90.
- 185 Westwood G.; Dibling B. C.; Cuthbert-Heavens D.; Burchill S. A. (2002):
Basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced cell death is mediated through a caspase-dependent and p53-independent cell death receptor pathway.
Oncogene. 21(5),S.809-24.
- 186 Wittekind Ch. Meyer HJ (Hrsg.) (2010):
TNM Klassifikation maligner Tumoren: UICC.(7. Auflage.

- 187 Wolff S.; Erster S.; Palacios G.; Moll U. M. (2008):
p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity.
Cell Research. 18(7),S.733-44.
- 188 Wood L. D.; Parsons D. W.; Jones S.; Lin J.; Sjoblom T., et al. (2007):
The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers.
Science. 318(5853),S.1108-13.
- 189 Yao H.; Li P.; Venters B. J.; Zheng S.; Thompson P. R., et al. (2008):
Histone Arg modifications and p53 regulate the expression of OKL38, a mediator of apoptosis.
Journal of Biological Chemistry. 283(29),S.20060-8.
- 190 Yeh F. T.; Wu C. H.; Lee H. Z. (2003):
Signaling pathway for aloe-emodin-induced apoptosis in human H460 lung nonsmall carcinoma cell.
International Journal of Cancer. 106(1),S.26-33.
- 191 Yi J.; Yang J.; He R.; Gao F.; Sang H., et al. (2004):
Emodin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis via generation of reactive oxygen species and inhibition of survival signaling.
Cancer Research. 64(1),S.108-16.
- 192 Yim H.; Lee Y. H.; Lee C. H.; Lee S. K. (1999):
Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of Rheum palmatum, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor.
Planta Medica. 65(1),S.9-13.
- 193 Yu F. S.; Yu C. S.; Chan J. K.; Kuo H. M.; Lin J. P., et al. (2006):
The effects of emodin on the expression of cytokines and functions of leukocytes from Sprague-Dawley rats.
In Vivo. 20(1),S.147-51.
- 194 Yu J. L.; Rak J. W.; Coomber B. L.; Hicklin D. J.; Kerbel R. S. (2002):
Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy.
Science. 295(5559),S.1526-8.
- 195 Yu J. Q.; Bao W.; Lei J. C. (2012):
Emodin Regulates Apoptotic Pathway in Human Liver Cancer Cells.
Phytotherapy Research.
- 196 Yu J. Q.; Bao W.; Lei J. C. (2013):
Emodin regulates apoptotic pathway in human liver cancer cells.
Phytotherapy Research. 27(2),S.251-7.
- 197 Yuan F.; Chen Y.; Dellian M.; Safabakhsh N.; Ferrara N., et al. (1996):
Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93(25),S.14765-70.
- 198 Zhang B.; Halder S. K.; Kashikar N. D.; Cho Y. J.; Datta A., et al. (2010):
Antimetastatic role of Smad4 signaling in colorectal cancer.
Gastroenterology. 138(3),S.969-80 e1-3.
- 199 Zhang G.; Dass C. R.; Sumithran E.; Di Girolamo N.; Sun L. Q., et al. (2004):
Effect of deoxyribozymes targeting c-Jun on solid tumor growth and angiogenesis in rodents.
Journal of the National Cancer Institute. 96(9),S.683-96.
- 200 Zhang L.; Chang C. J.; Bacus S. S.; Hung M. C. (1995):
Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin.
Cancer Research. 55(17),S.3890-6.
- 201 Zhang L.; Lau Y. K.; Xia W.; Hortobagyi G. N.; Hung M. C. (1999):
Tyrosine kinase inhibitor emodin suppresses growth of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells in athymic mice and sensitizes these cells to the inhibitory effect of paclitaxel.
Clinical Cancer Research. 5(2),S.343-53.
- 202 Zhang X. P.; Li Z. F.; Liu X. G.; Wu Y. T.; Wang J. X., et al. (2005):
Effects of emodin and baicalein on rats with severe acute pancreatitis.
World Journal of Gastroenterology. 11(14),S.2095-100.
- 203 Zhu F.; Liu X. G.; Liang N. C. (2003):
[Effect of emodin and apigenin on invasion of human ovarian carcinoma HO-8910PM cells in vitro]. Ai Zheng. 22(4),S.358-62.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Chris Braumann für die vertrauensvolle Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine fachkundige und stets freundliche Betreuung bei den praktischen und schriftlichen Arbeiten zu dieser Dissertation.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Braumann, insbesondere an Herrn Stephan Rogalla für die wissenschaftliche Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit. Für ihre hilfreiche Unterstützung im Labor möchte ich mich bei Frau Kirsten Führer und Frau Bettina Müller bedanken.

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl für die freundliche Übernahme der Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin und Ihre Unterstützung bei der Vollendung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für all ihre Unterstützung, mit der sie mir das Studium der Veterinärmedizin und die Anfertigung dieser Dissertation ermöglichten.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 15.11.2014

Maria Gall