

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
Universität des Saarlandes
Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger**

**Die Wirkung des
Phosphodiesterase-3-Inhibitors Cilostazol
auf das Tumorwachstum von kolorektalen
Lebermetastasen nach ausgedehnter
Leberteileresektion**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2014

vorgelegt von

Moritz Johannes Strowitzki

geboren am 3.6.1987 in München

1. Tag der Promotion:

2. Dekan: Prof. Dr. med. M. D. Menger

3. Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. D. Menger

Zweiter Berichterstatter:

Meiner „kleinen“ Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| 1 Zusammenfassung | 1 |
| 2 Summary..... | 3 |
| 3 Einleitung..... | 5 |
| 3.1 Klinischer Hintergrund | 5 |
| 3.1.1 Das kolorektale Karzinom..... | 5 |
| 3.1.2 Metastasierung | 6 |
| 3.1.3 Therapieformen | 7 |
| 3.2 Stimulation des Tumorwachstums bei Leberregeneration | 9 |
| 3.3 Cilostazol | 9 |
| 3.3.1 Klinische Anwendung | 9 |
| 3.3.2 Wirkmechanismus | 10 |
| 3.3.3 Cilostazol bei Leberregeneration und Tumorproliferation | 11 |
| 4 Ziel der Studie | 13 |
| 5 Material und Methoden..... | 14 |
| 5.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung | 14 |
| 5.2 Cilostazol | 14 |
| 5.3 Tumorzellen..... | 14 |
| 5.4 Versuchsanordnung und Versuchsablauf | 15 |
| 5.4.1 Anatomie der Rattenleber | 15 |
| 5.4.2 Anästhesie, Laparotomie und Verschluss des Abdomens..... | 17 |
| 5.4.3 Leberteileresektion und Sham-Operation | 18 |
| 5.4.4 Tumorzellimplantation..... | 20 |
| 5.5 Ultraschalluntersuchung zur Bestimmung des Tumolvolumens | 20 |
| 5.6 Mikrozirkulationsanalyse des Lebergewebes | 22 |
| 5.7 Histologie, Immunhistochemie und Western Blot | 23 |
| 5.7.1 Probengewinnung und Gewebeaufbewahrung..... | 23 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 5.7.2 | Histologische Färbungen (HE und CAE) | 23 |
| 5.7.3 | Immunhistochemie (PCNA, Caspase-3 und PECAM-1) | 27 |
| 5.7.4 | Western Blot Analyse (VEGF und ICAM-1) | 30 |
| 5.8 | Experimentelles Design | 32 |
| 5.9 | Datenerfassung und Statistik | 33 |
| 6 | Ergebnisse | 34 |
| 6.1 | Hepatozelluläre Vakuolisierung | 34 |
| 6.2 | Tumorwachstum | 36 |
| 6.2.1 | Systemische Auswirkungen der Tumorzellinjektion | 36 |
| 6.2.2 | Tumorvolumen | 36 |
| 6.2.3 | Tumorproliferation (PCNA-Färbung) | 39 |
| 6.2.4 | Tumorproliferation (Mitose-Figuren) | 41 |
| 6.2.5 | Tumorapoptose | 42 |
| 6.2.6 | Tumornekrose-Areale | 44 |
| 6.3 | Tumorvaskularisierung | 45 |
| 6.3.1 | Tumorvaskularisierung ohne Leberteilresektion | 45 |
| 6.3.2 | Tumorvaskularisierung mit Leberteilresektion | 47 |
| 6.3.3 | Vergleich Tumorvaskularisierung mit und ohne Leberteilresektion ... | 49 |
| 6.3.4 | VEGF-Expression | 49 |
| 6.4 | Mikrozirkulationsanalyse des Lebergewebes | 51 |
| 6.5 | Leukozytenakkumulation | 52 |
| 6.5.1 | Portale, intravasale Leukozytenakkumulation | 52 |
| 6.5.2 | Periportale Leukozytenextravasation | 53 |
| 6.5.3 | Parenchymatöse Leukozytenextravasation | 55 |
| 6.5.4 | ICAM-1-Expression | 57 |
| 7 | Diskussion | 59 |
| 7.1 | Diskussion von Material und Methoden | 59 |
| 7.1.1 | Das Modell der Tumorimplantation | 59 |
| 7.1.2 | Das Modell der Leberteilresektion | 60 |
| 7.1.3 | Untersuchungstechniken | 61 |

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| 7.2 Diskussion der Ergebnisse | 62 |
| 7.3 Schlussfolgerung | 68 |
| 8 Abkürzungsverzeichnis..... | 69 |
| 9 Literaturverzeichnis | 74 |
| 10 Publikationen | 86 |
| 11 Dank | 87 |
| 12 Lebenslauf | 89 |

1 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland. Jährlich werden etwa 65.000 Neuerkrankungen dokumentiert. Häufig entwickeln sich im Krankheitsverlauf Lebermetastasen. Diese bestimmen maßgeblich das Überleben der Patienten. Die Therapie der Wahl bei hepatischer Metastasierung ist auch heute noch die Resektion. Dabei wird eine Resektion von bis zu 75% des Lebergewebes toleriert. Dieses maximale Resektionsvolumen ist jedoch deutlich vermindert, wenn zusätzliche Lebererkrankungen, wie z.B. eine Leberzirrhose oder eine Fettleber, vorliegen.

Nach ausgedehnter Leberteileresektion führt die Hemmung der Phosphodiesterase-3 durch Cilostazol, wohl durch eine Steigerung des hepatischen Blutflusses, zu einer Beschleunigung der Leberregeneration. Bis heute ist jedoch nicht bekannt, ob Cilostazol auch das Wachstum von Lebermetastasen im verbliebenen Lebergewebe stimuliert. Allein die Leberresektion per se kann bereits zu einer Stimulation der Proliferation von in der restlichen Leber befindlichen Tumorzellen führen. Die vorliegende Studie wurde deshalb durchgeführt, um die Wirkung von Cilostazol auf das Tumorwachstum, auf die Tumorangiose und die Leukozytenakkumulation im Lebergewebe nach ausgedehnter Leberresektion zu untersuchen.

Für diesen Zweck wurden 14 WAG/Rij-Ratten mit Cilostazol (5mg/kg KG p.o. per Tag) 5 Tage vorbehandelt, und 14 Tiere als Kontrollgruppe mit der entsprechenden Trägersubstanz behandelt. Die Cilostazol-Behandlung wurde für die Dauer des gesamten Versuchs fortgeführt. Nach 5 Tagen wurden die Versuchstiere entweder ausgedehnt leberreseziert oder sham-operiert. Während dieser Operation wurde bei allen Ratten durch subkapsuläre Injektion von 5×10^5 CC531 rattenspezifischen Tumorzellen eines kolorektalen Karzinoms in den linken Leberlappen eine singuläre Lebermetastase induziert. An Tag 7 und 14 nach der Tumorimplantation wurde eine Ultraschalluntersuchung zur Bestimmung des Tumolvolumens durchgeführt. Die Tumolvaskularisierung und die Proliferation des normalen Lebergewebes und des Tumorgewebes wurden mittels Immunhistochemie und Western Blot Analyse bestimmt.

Cilostazol hatte keinen stimulierenden Einfluss auf das Tumorwachstum bzw. die Zellproliferation (PCNA-positive Zellen) der kolorektalen Lebermetastasen, unabhängig

davon, ob eine zusätzliche Leberteilresektion durchgeführt wurde oder nicht. Auch die Anzahl von apoptotischen Tumorzellen (cleaved Caspase-3-positive Zellen) unterschied sich nicht signifikant zwischen Cilostazol-behandelten Tieren und Vehikel-behandelten Kontrollen. Dennoch war Cilostazol in der Lage, das Ausmaß der Tumornekrose-Areale in Tieren ohne Leberresektion zu verringern. Dies war der Fall, obwohl die Behandlung mit Cilostazol zu einer signifikanten Abnahme der Vaskularisierung (PECAM-1-positive Zellen) vor allem in der Tumorperipherie führte. Dieser Effekt war nicht durch eine Hemmung von VEGF vermittelt. Des Weiteren inhibierte Cilostazol die Leukozytenextravasation (CAE-positive Zellen) in den Periportalfeldern verglichen mit Vehikel-behandelten Kontrollen. Diese Wirkung von Cilostazol war vermutlich durch eine Inhibierung der ICAM-1 Expression bedingt.

Es konnte gezeigt werden, dass der Phosphodiesterase-3-Inhibitor Cilostazol keinen Einfluss auf das Tumorwachstum von Lebermetastasen eines Kolonkarzinoms hat. Somit ist davon auszugehen, dass der Phosphodiesterase-3-Inhibitor ein Medikament von potentiell großem klinischem Nutzen zur Steigerung der Leberregeneration nach ausgedehnter Leberresektion darstellt.

2 Summary

Colorectal cancer is one of the most frequent cancers in Germany. Every year about 65.000 patients are diagnosed with colorectal cancer. Frequently, colorectal liver metastasis occurs during the course of this disease. This leads to a significant decrease of overall survival of these patients. In patients with hepatic metastases the first line therapy is still liver resection. If the patient has no comorbidities, resection of 75% of the liver mass is well tolerated. Yet, the amount of liver volume that can be resected without postoperative complications is substantially reduced when patients suffer from additional liver diseases, such as liver cirrhosis or hepatic steatosis.

Inhibition of phosphodiesterase 3 by cilostazol leads to an acceleration of liver regeneration after extended liver resection. This is most likely due to an increase of hepatic blood flow. However, there is no information yet, whether cilostazol by enhancing liver regeneration also stimulates the growth of liver metastases in the remnant liver tissue. Previous studies have shown that liver resection per se stimulates the proliferation of tumor cells within the remnant liver. The present study was now performed to investigate the effects of cilostazol on tumor growth, tumor angiogenesis and extravasation of leukocytes within normal liver tissue after extended liver resection.

For this purpose 14 WAG/Rij rats were pretreated with cilostazol (5mg/kg b.w. oral per day) for 5 days and 14 animals served as sham-treated controls. Cilostazol treatment was continued until the end of the experiment. After 5 days animals either received extended liver resection or sham-operation. During the surgical intervention a single liver metastasis was induced in the left liver lobe by subcapsular injection of 5×10^5 CC531 rat specific tumor cells of a colorectal carcinoma. At day 7 and 14 after tumor implantation ultrasound analysis was performed to determine tumor volumes. Tumor vascularization and proliferation of hepatocytes and tumor cells were analyzed by immunohistochemistry and Western blotting.

Cilostazol did not affect tumor growth and cell proliferation (PCNA-positive cells) of the colorectal liver metastases neither with nor without additional liver resection. In addition, apoptosis rates of tumor cells (cleaved caspase-3-positive cells) did not differ between cilostazol-treated animals and sham-treated controls. Yet, Cilostazol was capable of reducing tumor necrotic areas in animals without liver resection. This was even

the case although treatment with cilostazol significantly reduced the tumor vascularization (PECAM-1-positive cells) especially in the periphery of the tumors. Of interest, this effect was not dependent on VEGF expression. Furthermore, cilostazol was capable of inhibiting extravasation of leukocytes (CAE-positive cells) in periportal areas compared to sham-treated controls. This effect of cilostazol was probably due to an inhibitory action on ICAM-1 expression.

This study shows that the phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol does not stimulate the tumor growth of colorectal liver metastases in remnant liver tissue after major resection. Hence, cilostazol might be a promising candidate of great clinical value stimulating pharmacologically liver regeneration after extended liver resection.

3 Einleitung

3.1 Klinischer Hintergrund

3.1.1 Das kolorektale Karzinom

Krebserkrankungen jeglicher Art sind laut des **Global Burden of Disease Report** nach Herz-Kreislauf-erkrankungen und Infektionen die dritthäufigste Todesursache weltweit. Verantwortlich dafür sind unter anderem die zunehmende Industrialisierung vieler Schwellenländer und die damit verbundene steigende Lebenserwartung der Bevölkerung weltweit. Dabei zeigen sich laut WHO-Report beträchtliche regionale Unterschiede. Während in westlichen Industrieländern eher Herz-Kreislauf- und Tumorerkrankungen führend sind, spielen für die Mortalität in Entwicklungsländern Infektionserkrankungen, insbesondere der Lunge, mit jährlich 2,9 Millionen Toten die wichtigste Rolle (World Health Organization, 2008).

Nicht nur die Todesursachen unterscheiden sich abhängig von dem durchschnittlichen Pro-Kopf Einkommen global, sondern auch innerhalb aller Neoplasien gibt es aufgrund des jeweiligen Ernährungsverhaltens deutliche Unterschiede (Wang et al., 2012). In der Bundesrepublik Deutschland haben Datenerhebungen des nationalen epidemiologischen Krebsregisters von 2008 gezeigt, dass jährlich rund 35.000 Männer und 30.000 Frauen an einem **kolorektalen Karzinom** (KRK) neu erkranken. Somit betrifft jede siebte Krebserkrankung in Deutschland den Darm (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2012). Wenn man vereinfachend davon ausgeht, dass die Inzidenzraten des kolorektalen Karzinoms für Deutschland die nächsten Jahre annähernd konstant bleiben, wird es dennoch durch die demographische Entwicklung der Bevölkerung einen massiven Anstieg der absoluten Neuerkrankungen geben (Haberland et al., 2010). Die jährliche Sterblichkeitsrate dagegen konnte durch Methoden der Früherkennung, wie z.B. der Koloskopie, drastisch gesenkt werden (Majek et al., 2012). Zudem senkt eine Koloskopie im Sinne der Früherkennung für bis zu 10 Jahre das Risiko an einem KRK zu erkranken (Brenner et al., 2014). Ebenso konnte die 5-Jahresüberlebensrate der Patienten, die an Darmkrebs erkrankten, in den letzten Jahrzehnten durch neue Therapieansätze deutlich angehoben und so das Überleben verbessert werden (Majek et al., 2012). In den USA sind die

Inzidenzraten minimal abnehmend. Dennoch gehört das kolorektale Karzinom mit einer Prävalenz von 9%, ähnlich wie in Deutschland, zu den drei häufigsten Krebserkrankungen bei Männern (Siegel et al., 2012). Zusammengefasst zählt es weltweit zu den fünf häufigsten Tumorerkrankungen der westlichen Industrienationen (Konopke und Saeger, 2003).

In 95% der Fälle tritt das kolorektale Karzinom sporadisch auf. Die hereditär bedingte Form ist mit 5% dagegen selten. Dabei steigt das **Erkrankungsrisiko** mit fortschreitendem Alter stetig an. Während das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zu einem Darmtumor führt, stellt die familiäre Adenomatosis Polyposis Coli (FAP) eine obligate Präkanzerose dar (Möslein, 2008). Auch andere Risikofaktoren, v.a. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, ballaststoffarme Ernährung, sowie Umweltfaktoren, können das Risiko für Patienten, an Darmkrebs zu erkranken, erhöhen.

3.1.2 Metastasierung

Die Leber stellt auf Grund der venösen Drainage des Kolons über die Pfortader den bedeutendsten Zielort für kolorektale hämatogene Fernmetastasen dar (Weiss et al., 1986). 50% aller Patienten mit einem primären KRK entwickeln zusätzlich **Lebermetastasen**. Manche Untersuchungen zeigen sogar, dass rund 70% der Patienten nach Feststellung eines kolorektalen Karzinoms im Verlauf der Erkrankung zumindest singuläre Metastasen entwickeln. Wie entscheidend das Ausmaß der Metastasierung für den Ausgang dieser Krebserkrankung ist, konnten Taylor et al. nachweisen. Laut ihren Untersuchungen haben etwa 90% der Menschen, die aufgrund eines KRKs versterben, Lebermetastasen. Zudem wird vermutet, dass wohl die meisten, wenn nicht alle Patienten von einer Mikrometastasierung in das Lebergewebe betroffen sind (Fisher und Fisher, 1959; Konopke et al., 2012; Ruers und Bleichrodt, 2002; Taylor, 1996). Schon bei Erstdiagnose haben 23%-52% der an einem kolorektalen Karzinom Erkrankten synchrone, d.h. zum Zeitpunkt der Diagnose schon vorhandene, hepatische Metastasen (Fahy, 2012; Høyer et al., 2011; Siegel et al., 2012). 30-40% der Patienten entwickeln zudem nach primärer Operation mit kurativer Intention metachrone, d.h. im Verlauf der Krankheit sich entwickelnde, Metastasen (Flieger et al., 2004; von Heesen et al., 2011). Ohne Therapie besteht bei einem metastasierten KRK keine Heilungschance. Die Prognose ist mit einem mittleren Überleben von 6-12 Monaten äußerst schlecht

(Bengtsson et al., 1981; Görög et al., 1997). Der Tod des Patienten tritt zumeist auf Grund von Leberversagen durch die hepatische Streuung des Malignoms ein (Konopke und Saeger, 2003).

3.1.3 Therapieformen

Lebermetastasen eines KRK können laut der aktuellen S3-Leitlinie für die Behandlung eines kolorektalen Karzinoms auf verschiedene Art und Weise therapiert werden (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2013). Die **Leberresektion** ist dabei der einzige kurative Ansatz, sofern die Lebermetastasen als resektabel anzusehen sind (Morris et al., 2010; Rees et al., 2008). Dadurch steigt die mittlere Überlebenszeit von 6 bis 12 Monaten ohne chirurgische Intervention auf eine 5-Jahresüberlebensrate von bis zu 40% (Bengtsson et al., 1981; Görög et al., 1997; Choti et al., 2002; Rees et al., 2008). In erfahrenen Zentren beträgt die Letalität bedingt durch den chirurgischen Eingriff weniger als 5% (Nordlinger et al., 2008; Poon et al., 2004). Neben der Leberresektion existieren noch weitere nicht kurative Verfahren zur Behandlung von kolorektalen Lebermetastasen. Dazu zählen die Alkoholablationstherapie, die Kryotherapie, die Laserinduzierte Interstitielle Thermotherapie (LITT) und die Radiofrequenzablation (Konopke et al., 2012). Zudem besteht adjuvant die Möglichkeit einer systemischen oder regionalen Gabe von Chemotherapeutika, wie z.B. Fluorouracil, Irinotecan, Leucovorin, Oxaliplatin, Bevacizumab oder Cetuximab (Douillard et al., 2003; Kelly und Goldberg, 2005). Sie alle verfolgen das Ziel der Tumorreduktion. Vor allem die neoadjuvante Gabe von Chemotherapeutika bietet die Möglichkeit, dass primär irresektable Lebermetastasen sekundär, d.h. durch Verkleinerung nach der Therapie, resektabel werden (Ismaili, 2011).

Somit ist die Leberresektion immer noch der „Goldstandard“ für die Therapie von Lebermetastasen auf Grund eines kolorektalen Karzinoms (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, 2013). Durch die enorme **Regenerationskapazität** sind Resektionen von bis zu 75% des Lebergewebes möglich. Bei Resektionen von mehr als 75% der gesamten Leber kommt es häufig zu einer unzureichenden Regeneration des restlichen Lebergewebes (Clavien et al., 2007) und damit zu einer Insuffizienz der verbliebenen Leber. Besonders Patienten, die an zusätzlichen Lebererkrankungen, wie Leberzirrhose, Fettleber oder Chemotherapie-assoziiertes Steatohepatitis leiden, sind davon betroffen (Gomez et al., 2007; Nordlinger et al., 2008; Vauthey et al., 2006).

Es stehen mehrere Strategien zur Verfügung, um die Regeneration der Leber zu

stimulieren und dadurch einem Funktionsverlust der Restleber nach einer Leberteileresektion vorzubeugen. Die präoperative **Pfortaderokklusion** entweder durch Embolisation oder Ligatur ist hierbei eine etablierte Methode. Dabei werden Pfortaderäste, die den tumortragenden Leberlappen mit Blut versorgen, verschlossen. Dies bewirkt eine Atrophie der betroffenen Abschnitte der Leber und eine Hypertrophie des restlichen Leberparenchyms (Clavien et al., 2007; Hemming et al., 2003). Zusätzlich kann bei Patienten mit ausgedehntem metastatischem Befall der gesamten Leber eine **zweizeitige Leberteileresektion** durchgeführt werden. Auf diese Weise kann das maximale Leberresektionsvolumen weiter erhöht werden (Wicherts et al., 2008). Die Kombination dieser beiden Verfahren erhöht die Anzahl der möglichen kurativen Leberresektionen, die sicher durchführbar sind, und wird im klinischen Alltag immer wieder eingesetzt (Primrose, 2010).

Medikamentöse Strategien, um die Leberregeneration nach erweiterter Leberresektion zu erhöhen, sind dagegen noch nicht als standardisierte Verfahren in der klinischen Praxis etabliert. Es gibt jedoch zahlreiche experimentelle Untersuchungen, die **pharmakologische und gentechnologisch basierte Ansätze** verfolgen, um die Leberregeneration und das postoperative Überleben zu verbessern. Nishino et al. konnten 2008 zeigen, dass der Transfer eines human hepatocyte growth factor (HGF)-Gens in das Genom einer Ratte dazu führte, dass das Gesamtüberleben der Versuchstiere nach partieller Hepatektomie signifikant anstieg (Nishino et al., 2008). Ferner steigerte die 3-tägige Gabe von Erythropoietin (EPO) die Leberregeneration in Ratten nach 70% Leberresektion und das Überleben nach 90% Resektion. Die Expression von PCNA und Ki-67, beides Marker für Zellproliferation, war dabei in Hepatozyten von behandelten Tieren signifikant erhöht (Schmeding et al., 2008). Ebenfalls zu einer Steigerung der hepatischen Regeneration von Ratten nach partieller Hepatektomie führt die medikamentöse Therapie mit Sildenafil, einem Phosphodiesterase-5-Inhibitor. Dabei spielen die potenzierenden Effekte von Sildenafil auf NO in der Leber eine entscheidende Rolle. Erstens führt NO zu einer erhöhten Relaxation der vascular smooth muscle cells und erhöht so den Blutfluss der Pfortader zur Leber. Zweitens verringert NO in geringen Konzentrationen die Apoptoserate der Hepatozyten (Yardimci et al., 2012). Etliche weitere tierexperimentelle Studien belegen den Nutzen von pharmakologischen Interventionen, um die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie zu erhöhen (Cho et al., 2009; Uzun et al., 2009).

3.2 Stimulation des Tumorwachstums bei Leberregeneration

Nach einer ausgedehnten Leberresektion auf Grund von kolorektalen Lebermetastasen treten bei bis zu 50% der Patienten erneut Tumormetastasen im verbleibenden Lebergewebe auf (Christophi et al., 2008; Krause et al., 2013; Paschos und Bird, 2010). Man geht davon aus, dass es zirkulierende Tumorzellen oder Mikrometastasen im restlichen Lebergewebe sind, die im Anschluss an eine **partielle Hepatektomie** stimuliert werden und wieder einen Tumor entstehen lassen (de Jong et al., 1996, Harun et al., 2007). Zum einen ist dabei das Ausmaß der Resektion entscheidend. Zum anderen ist die einsetzende **Leberregeneration**, die mit einer Ausschüttung von einer Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren einhergeht, dafür verantwortlich, dass es wieder zu metastatischem Wachstum kommt (Harun et al., 2007; Michalopoulos, 2007). Vor allem **Wachstumsfaktoren**, wie der hepatocyte growth factor (HGF), der epidermal growth factor (EGF) und der insulin-like growth factor (IGF), wirken nachweislich nicht nur stimulierend auf die Hepatozyten, sondern auch auf die Proliferation, die Migration und das invasive Potential von Tumorzellen (Harun et al., 2007). Koh et al. konnten zudem zeigen, dass das Renin-Angiotensin-System (**RAAS**) während der Leberregeneration dazu beiträgt, die verbliebenen Tumorzellen zu stimulieren und deren Wachstum anzuregen. Der Einfluss des RAAS auf die Tumorangiogenese ist dabei entscheidend (Koh et al., 2010).

Medikamente, die stimulierend auf die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie wirken, sind demnach potentiell in der Lage, ebenfalls das Tumorwachstum zu stimulieren und sollten in diesem Zusammenhang immer kritisch hinterfragt werden.

3.3 Cilostazol

3.3.1 Klinische Anwendung

Cilostazol (6-[4-(1-cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone; OPC-13013) (siehe Abb. 1), ist ein Phosphodiesterase-3-Inhibitor, der von der FDA (US Food and Drug Administration) zur Behandlung von Patienten mit pAVK (periphere arterielle Verschlusskrankheit) und damit verbundenen intermittierenden Claudicatiobeschwerden zugelassen ist (Hiatt, 2005). Dabei verbessert Cilostazol die Lebensqualität vor allem dadurch, dass die Patienten in der Lage sind, eine längere

Strecke beschwerdefrei zu gehen (Collins und Brittenden, 2004). Dies konnten Strandness et al. an 394 Patienten, die an **Claudicatio intermittens** auf Grund von pAVK litten, zeigen. Die maximale Gehstrecke stieg dabei um durchschnittlich 21%. Unterstützt wurden diese Erkenntnisse durch eine Verbesserung der Lebensqualität und der Verfassung der einzelnen Patienten (Strandness et al., 2002). Die Prävalenz der **pAVK** liegt laut amerikanischen Untersuchungen zwischen 3% bis 27% bei den 45- bis 60-Jährigen und nimmt mit ansteigendem Alter zu (Newman et al., 1991; Zheng et al., 1997). Bis zu ein Drittel dieser Patienten leidet dabei an Claudicatio-Beschwerden (Zheng et al., 1997). Das macht Cilostazol zu einem höchst interessanten Medikament bei Patienten, die häufig mehrfach erkrankt sind.

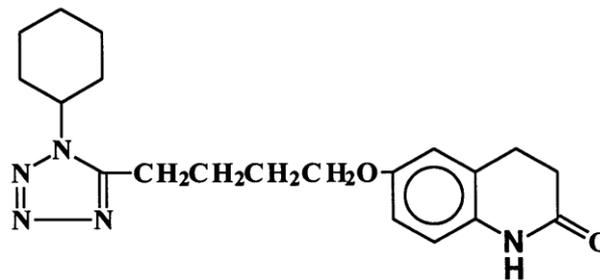


Abbildung 1: Cilostazol (6-[4-(1-cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone; OPC-13013). (Abb. aus Tata et al., 1998).

3.3.2 Wirkmechanismus

Über die selektive Inhibierung der Phosphodiesterase-3 führt Cilostazol zu einer Erhöhung der zellulären **cAMP**-Konzentration (Schrör, 2002). Der genaue Wirkungsmechanismus, über den Cilostazol zu einer Verbesserung der pAVK-assoziierten Claudicatio führt, ist unklar. Seit mehr als einem Jahrzehnt ist jedoch bekannt, dass Cilostazol zu einer NO-vermittelten **Vasodilatation** des Endothels führt (Nakamura et al., 2001). Zudem erhöht Cilostazol in tierexperimentellen Untersuchungen den Blutfluss der Extremitäten (Weintraub, 2006). Untersuchungen zeigen, dass Cilostazol die **Thrombozytenaktivierung, -aggregation** und die **Thromboseraten** senkt. Die Plättchenhemmung wird dabei vermutlich über die Hemmung der Phosphodiesterase-3 und die damit verbundene Ansammlung von cAMP vermittelt. Interessanterweise ist dabei aber nicht die Blutungszeit verlängert (Tamai et al., 1999). Ebenso verbessert

Cilostazol das **Lipidprofil** von Patienten, d.h. es senkt die Triglyceride und erhöht die high density lipoproteins (HDLs). Die **antiproliferativen** Effekte von Cilostazol auf das Wachstum der vascular smooth muscle cells (VSMCs) zeigen sich in deutlich verringerten Restenoseraten nach koronarer Stentimplantation bei Patienten mit Cilostazol-Behandlung (Friedland et al., 2012; Geng et al., 2012; Weintraub, 2006). Kayanoki et al. konnten zeigen, dass Cilostazol in diesem Zusammenhang den heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) in Makrophagen und VSMCs inhibiert (Kayanoki et al., 1997). HB-EGF ist eines der potentesten Mitogene für vascular smooth muscle cells, sodass Cilostazol wahrscheinlich durch die Störung der Migration von VSMCs antiproliferativ wirkt. Diese Effekte zusammen führen dazu, dass Cilostazol die Symptome der Claudicatio intermittens bei der pAVK reduziert.

3.3.3 Cilostazol bei Leberregeneration und Tumorproliferation

Schon 1998 haben Ikeda et al. die Effekte von Cilostazol auf die Leberregeneration und das Gesamtüberleben untersucht. Sie induzierten hierzu Lebertumoren in Ratten und führten anschließend eine 2/3 Hepatektomie durch. Dabei konnten sie zeigen, dass die Ratten, die ausschließlich mit Cilostazol behandelt wurden, signifikant länger überlebten als Kontroll-Tiere. Diesen Vorteil im Überleben führten sie hypothetisch auf eine **antiproliferative Wirkung** des Cilostazol auf die Tumormetastasen zurück, konnten dies aber nicht zeigen (Ikeda et al., 1998). Erst kürzlich konnten Uzawa et al. diese Erkenntnisse unterstützen und belegen, dass die Inhibierung der Phosphodiesterase-3 durch Cilostazol die Sensitivität von menschlichen Tumorzellen gegenüber Cisplatin erhöht. Dabei wurden Mäusen in einem Xenograft-Model subkutan humane Tumorzellen injiziert, um das Tumorwachstum zu beurteilen. Die Mäuse, die mit Cilostazol und Cisplatin behandelt wurden, zeigten im Verlauf ein signifikant geringeres Tumolvolumen als die restlichen Tiere. Zurückzuführen war dies vermutlich auf eine deutlich gesteigerte antiproliferative Wirkung durch die Kombination von Cilostazol und Cisplatin. Konsekutiv waren Marker für Proliferation, PCNA und Ki-67, vermindert und Caspase-3, ein Marker für Apoptose, im Tumorgewebe erhöht (Uzawa et al., 2013).

Dagegen zeigen andere Studien, dass im gesunden Gewebe die Inhibierung der Phosphodiesterase-3 durch Amrinone zu einer **Steigerung der Leberregeneration** und -funktion nach 70% Leberresektion führt. Dies wurde durch signifikante Unterschiede des Lebergewichts, der Transaminasen, der Bilirubin-Werte, des mitotischen Index und von

Markern wie PCNA zwischen den mit Amrinone behandelten Ratten und den Kontrolltieren belegt (Akcan et al., 2006).

In unserer Arbeitsgruppe konnten wir vergleichbare Ergebnisse durch die Inhibierung der Phosphodiesterase-3 mittels Cilostazol erzielen. Dold et al. konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Cilostazol den venösen Blutfluss der Pfortader und die Mikrozirkulation signifikant erhöht. Dies war mit einer vermehrten Expression des vascular endothelial growth factors (VEGF), einer erhöhten Hepatozyten-Proliferation und einer Beschleunigung der Leberregeneration verbunden. Zudem zeigte sich ein **hepatoprotektiver Effekt** durch Cilostazol, sodass davon auszugehen ist, dass Cilostazol in der Lage ist, die Leberregeneration nach ausgedehnter Resektion zu verbessern und so eventuell das Risiko eines Leberversagens der verbliebenen Leber nach Leberteileresektion zu senken (Dold et al., 2011).

4 Ziel der Studie

Cilostazol, ein Phosphodiesterase-3-Inhibitor, ist in der Lage, die Leberregeneration nach 70% Leberresektion zu erhöhen (Dold et al., 2011). Ein Einsatz in der hepatischen Metastasen Chirurgie setzt aber voraus, dass Cilostazol nicht ebenso das Wachstum von kolorektalen Lebermetastasen anregt. Ziel der Arbeit war es deshalb, im Rattenmodell mögliche Effekte von Cilostazol auf das Tumorstadium und die Vaskularisierung kolorektaler Metastasen innerhalb der Restleber nach Resektion zu untersuchen. Insbesondere waren folgende Fragestellungen von Interesse:

- Beeinflusst Cilostazol das **Tumorstadium** oder die **Tumorstadium** nach Leberteilresektion?
- Hat Cilostazol einen Einfluss auf die **Proliferation** bzw. auf die **Apoptose** von Hepatozyten im normalem Lebergewebe und Tumorzellen in kolorektalen Metastasen nach Leberteilresektion?
- Beeinflusst Cilostazol das Ausmaß der **Nekrose-Areale** innerhalb der kolorektalen Metastasen?
- Beeinflusst Cilostazol die **Zellmorphologie** der Hepatozyten in normalem Lebergewebe oder der Tumorzellen in kolorektalen Metastasen?
- Beeinflusst Cilostazol die Hämodynamik der Restleber nach Leberteilresektion?
- Hat Cilostazol eine signifikante Wirkung auf die Immunantwort nach Tumorstadium, gemessen anhand der **Leukozytenextravasation** in das Leberparenchym? Wird diese durch die endotheliale Expression von ICAM-1 vermittelt?

5 Material und Methoden

5.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Alle Experimente wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes und den Richtlinien der UKCCCR durchgeführt. Die Versuchstierhaltung stand unter der Aufsicht der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes, Frau Dr. med. vet. M. Frings.

Als Versuchstiere dienten insgesamt 28 weibliche WAG/Rij-Ratten (Charles River, Sulzfeld, BRD), die in unterschiedliche Versuchsgruppen aufgeteilt wurden. Bis zum Versuchsbeginn befand sich ein Tier pro Käfig unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur: 22°C, relative Luftfeuchtigkeit: 55% \pm 10%) mit einem Hell-Dunkelrhythmus von 12 Stunden in konventioneller Tierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar. Das Körpergewicht der Tiere betrug 220-260g. Standardlaborfutter (Fa. Altromin, Lage, BRD) und Wasser ad libitum standen jedem Versuchstier während der gesamten Dauer der Haltung zur Verfügung.

5.2 Cilostazol

Der Phosphodiesterase-3-Inhibitor Cilostazol wurde hergestellt und vertrieben von Schwarz Pharma GmbH mit Sitz in Monheim am Rhein, BRD. Der Handelsname des Präparats lautet Pletal®. Eine Tablette enthält 100mg des Wirkstoffs Cilostazol.

5.3 Tumorzellen

Die verwendete rattenspezifische Kolonkarzinomzelllinie CC531 (CLS; Cell Lines Service and Tumor-Cellbank; Heidelberg, BRD) wurde bei -180°C in flüssigem Stickstoff in 1,8ml Kryogefäßen (Nunc, Roskilde, DK) konserviert. Die Gefäße wurden zur Kultivierung in 37°C temperiertem Wasser aufgetaut und die Oberfläche der Gefäße mit 70% Isopropanol desinfiziert. Im Anschluss wurden die Tumorzellen in ein 50ml Zentrifugenröhrchen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD) mit vorgelegtem, Raumtemperatur-equilibriertem, FCS-haltigem Kulturmedium (FCS; Foetal calf serum;

Gold, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, BRD) überführt. Es folgten zwei fünfminütige Zentrifugationsschritte (Universal 30 F; Hettich, Tuttlingen, BRD) bei 1600U/min (400xg). Die Zellen wurden daraufhin in Petrischalen (Cellstar; 100/20mm, Greiner Bio-One, Frickenhausen, BRD) ausgesät und bei 37°C unter einer 5% humiden CO₂-Atmosphäre in RPMI 1640 Medium (PAA Laboratories GmbH) kultiviert. Jeden zweiten Tag wurde ein Medienwechsel vollzogen. Zur Vermehrung wurden die Zellen nach Vorliegen einer Konfluenz von etwa 70-80% passagiert (vgl. Sperling, 2007).

Für die Injektion der Tumorzellen wurden diese mit 0,02% Trypsin/EDTA-Lösung (0,5g/l; 0,2g/l; Virolex; PAA Laboratories GmbH) versetzt und mit dem Enzym Accutase (PAA Laboratories GmbH) aus den Kulturgefäßen gelöst. Der Zellansatz wurde für circa 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Enzymwirkung mit FCS-haltigem Kulturmedium neutralisiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (5min, 1600U/min), wobei die Zellen zweimal mit PBS (Phosphat buffered solution; PAA Laboratories GmbH) gewaschen wurden. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 verdünnt und bis zur nächsten 70-80% Konfluenz kultiviert. In der folgenden zweiten Passage wurden die Zellen noch einmal 1:4 bis 1:5 verdünnt. Zwei Tage nach der Passagierung wurden die Zellen für die Experimente eingesetzt. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Leica DMIL, Solms, BRD) bei einer 100x Gesamtvergrößerung (Objektiv Leica C Plan 10x/0.22, PH1, Okkular Leica 10x/18) in einer Neubauer-Zählkammer. Diese war auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/30µl PBS eingestellt (vgl. Sperling, 2007).

5.4 Versuchsanordnung und Versuchsaufbau

5.4.1 Anatomie der Rattenleber

Zum besseren Verständnis wird eine einheitliche Terminologie der Anatomie der Rattenleber eingeführt: Im Gegensatz zum Menschen wird die Rattenleber aus mehreren deutlich voneinander abgrenzbaren Leberlappen gebildet (siehe Abb. 2). Die beiden großen Leberlappen, median (ML) und links lateral gelegen (LLL), umfassen zusammen ca. 70% des Lebervolumens. Der ML lässt sich weiterhin in einen rechten (RM) und linken medianen Leberlappen (LM) unterteilen. Nach dem Durchtrennen der Ligamente und dem Anheben und Verlagern der großen Leberlappen befindet sich rechts der Vena cava inferior (IVC) ein nach unten spitz zulaufender, der IVC anliegender rechter Leberlappen,

welcher sich in einen superioren rechten (SRL) und einen inferioren rechten Leberlappen (IRL) unterteilt. Zusammen umfassen SLR und IRL ca. 22% des Lebervolumens. Der kaudale Leberlappen (CL) teilt sich in drei weitere kleinere Leberlappen: Lobus caudatus anterior (AC), Lobus caudatus posterior (PC) und kaudaler Fortsatz (CP). AC und PC liegen links der IVC, an den Magen angrenzend und tragen je knapp 4% zum Lebervolumen bei. Dabei entsprechen die 6 Leberlappen (1) CL, (2) LLL, (3) LM, (4) RM, (5) IRL und (6) SRL der Ratte jeweils den menschlichen Lebersegmenten (1) I und IX; (2) II; (3) III und IV; (4) V und VIII; (5) VI; und (6) VII nach Couinaud (Martins et al., 2008).

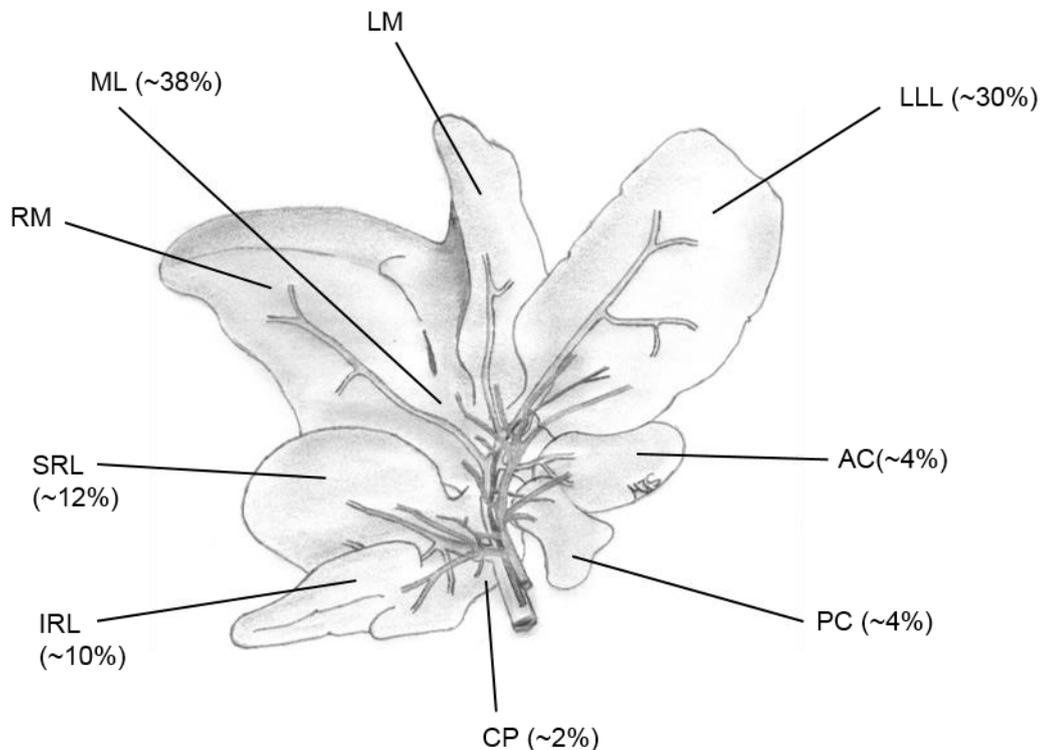


Abbildung 2: Anatomie der Rattenleber. Die Zeichnung zeigt den Leberhilus einer Ratte mit dem portalen Gefäßsystem, dem arteriellen Gefäßsystem und dem biliären Drainagesystem. ML: mittlerer Leberlappen; LM: linker mittlerer Leberlappen; RM: rechter mittlerer Leberlappen; LLL: linker lateraler Lappen; SRL: superiorer rechter Leberlappen; IRL: inferiorer rechter Leberlappen; AC: Lobus caudatus anterior; PC: Lobus caudatus posterior; CP: kaudaler Fortsatz (Abbildung modifiziert nach Aller et al., 2012 und Martins et al., 2008).

5.4.2 Anästhesie, Laparotomie und Verschluss des Abdomens

Alle Operationen im Rahmen der vorliegenden Studie wurden in Vollnarkose durchgeführt. Dabei erhielten die Tiere eine Inhalationsnarkose mittels Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, BRD).

Nach Bestimmung des präoperativen Körpergewichts der Tiere wurde der Bauchbereich der Versuchstiere mit einem Elektrorasierer (Electra GH 204; Aesculap, Tuttlingen, BRD) rasiert. Dieser Bereich wurde ausgiebig durch Aufsprühen einer Desinfektionslösung (Softasept® N, B. Braun AG, Melsungen, BRD) desinfiziert. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, wurde den Ratten Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, BRD) lokal appliziert. Im Anschluss wurden die Tiere in Rückenlage mittels Pflasterstrips auf einer temperierten Heizplatte (Effenberger, Pfaffing/Attel, BRD), die eine mittlere Körperkerntemperatur von 38°C der Versuchstiere gewährleistete, fixiert.

Daraufhin wurde das Abdomen mittels einer medianen Laparotomie eröffnet. Hierfür wurde zuerst mit einer groben Schere die Haut und danach mittels einer feineren Schere die Muskelfaszie ohne Muskelgewebe zu verletzen entlang der Linea alba durchtrennt. Die Hautränder wurden durch Wundhaken, welche über Magnetständer auf dem Operationstisch fixiert waren, aufgespannt. Anschließend wurden entweder eine Leberteilresektion oder eine Sham-Operation (vgl. 5.4.3) und die Tumorzellimplantation (vgl. 5.4.4) durchgeführt. Für die Ultraschalluntersuchungen zur Bestimmung der Tumorumfänge an Tag 7 und Tag 14 (vgl. 5.5) wurden die Tiere analog zur dem oben beschriebenen Verfahren relaparotomiert.

Die Laparotomie wurde zweischichtig mit 4-0 Prolene (4-0 Ethicon Prolene, Polypropylen, Johnson-Johnson Intl, Norderstedt, BRD) verschlossen.

Nach Abschluss der Operation wurden die Tiere wieder in Einzelkäfige gesetzt. Um Auskühlung zu vermeiden, verbrachten sie die ersten postoperativen Stunden unter einer Rotlichtlampe (efbe Elektrogeräte GmbH, Bad Blankenburg, BRD).

5.4.3 Leberteileresektion und Sham-Operation

Nach 5.4.2 wurden die Ligamente der beiden Leberlappen (ML und LLL) zum Zwecke der besseren Mobilisation scharf mit einer Schere durchtrennt und das gesamte Intestinum linksseitig ausgelagert. Um das Austrocknen des Darmes zu verhindern, wurden die Darmschlingen vorsichtig auf einer Mullkompressen (Fink & Walter GmbH, Merchweiler, BRD) gelagert und während der gesamten Operation mit warmer Kochsalzlösung befeuchtet. Einzelne Gewebeschichten wurden durch stumpfe Präparation voneinander getrennt. Feuchte Tupfer und Kompressen wurden benutzt, um das Operationsgebiet freizuhalten, indem Gewebestrukturen entweder zur Seite mobilisiert oder einfach nur beschwert wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine 2/3 Leberteileresektion durchgeführt. Das Modell der 2/3 Leberteileresektion bei der Ratte wurde zuerst von Higgins und Anderson beschrieben (Higgins und Anderson, 1931). Dabei werden der ML und der LLL der Rattenleber reseziert. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen eine Modifikation mit Resektion der Leberlappen ML, SRL, IRL und CP durchgeführt (Martins et al., 2008). Die mikrochirurgische Resektion aller Leberlappen erfolgte dabei immer auf die gleiche Art und Weise. Zuerst wurden die Gefäße im Hilusbereich der Leber sowie der zugehörige Gallengang des Leberlappens mit geflochtener Seide (Schwarz, 6/0 USP 0,7metric, Resorba Wundversorgung GmbH und Co. KG, Nürnberg, BRD) ligiert und nach Dunkelfärbung des Leberparenchyms mittels Schere reseziert. Dabei wurde darauf geachtet, weder die IVC noch das Diaphragma zu verletzen, so dass zu keinem Zeitpunkt der OP die IVC komprimiert oder beschädigt wurde. Am Ende wurde das komplette Resektat gewogen. Im Situs der leberteileresezierten Tiere verblieben somit die Leberlappen LLL, AC und PC (siehe Abb. 3A). Bei sham-operierten Tieren wurden nur die Ligamente der Leberlappen durchtrennt ohne das Lebergewebe zu beschädigen oder zu entfernen.

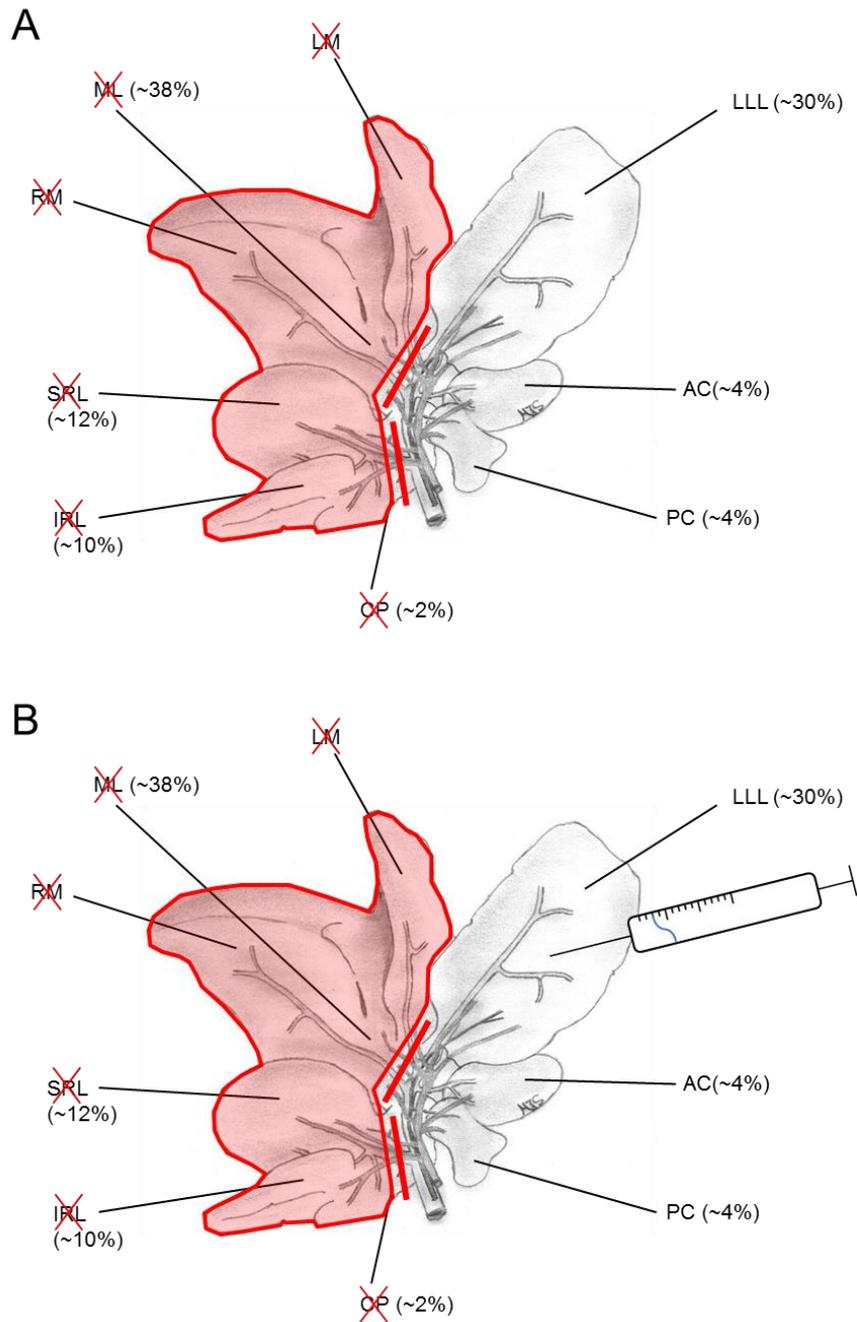


Abbildung 3: Leberresektion (A) der Leberlappen ML, SRL, IRL und CP. Während der gleichen OP erfolgte anschließend die Tumorzellimplantation (B) in die Unterseite des LLL (Abbildungen modifiziert nach Aller et al., 2012 und Martins et al., 2008).

5.4.4 Tumorzellimplantation

Direkt nach der Leberresektion bzw. Sham-Operation erfolgte bei allen Tieren die Tumorzellimplantation. Die Tumorzellen wurden über eine 27G Kanüle (Omnicon F, B. Braun AG) unter Zuhilfenahme feuchter Wattestäbchen zur Leberfixation subkapsulär in die kaudale Leberseite des linken Leberlappens (LLL) injiziert (siehe Abb. 3B). Pro Injektion betrug die Tumorzellzahl 5×10^5 Zellen. Ein Nachbluten und eine Tumorzellaussaat über den Injektionskanal in das Peritoneum wurde verhindert, indem beim Entfernen der Kanüle aus der Leber die Einstichstelle mit Histoacrylkleber (Histoacryl®; Aesculap) verschlossen wurde (Kollmar et al., 2004; vgl. Sperling, 2007). Der vorher ausgelagerte Darm wurde wieder in die Bauchhöhle zurückverlagert. Zur Flüssigkeitssubstitution wurde das Abdomen wiederholt mit 0,9%iger Kochsalzlösung gespült. Das Abdomen wurde durch eine fortlaufende Naht zweireihig verschlossen (vgl. 5.4.2).

5.5 Ultraschalluntersuchung zur Bestimmung des Tumorumfanges

Sieben und 14 Tage nach der Tumorzellimplantation erfolgten die Volumenmessungen der induzierten Tumore bei allen Tieren mit dem hochauflösenden Ultraschallsystem Vevo770 (VisualSonics, Toronto, Kanada). Dafür wurden die Tiere in Narkose versetzt und relaparotomiert (vgl. 5.4.2). Vor der eigentlichen Untersuchung wurde Ultraschallgel (Aquasonic 100; Parker, Fairfield, NJ, USA) auf den Leberlappen aufgetragen.

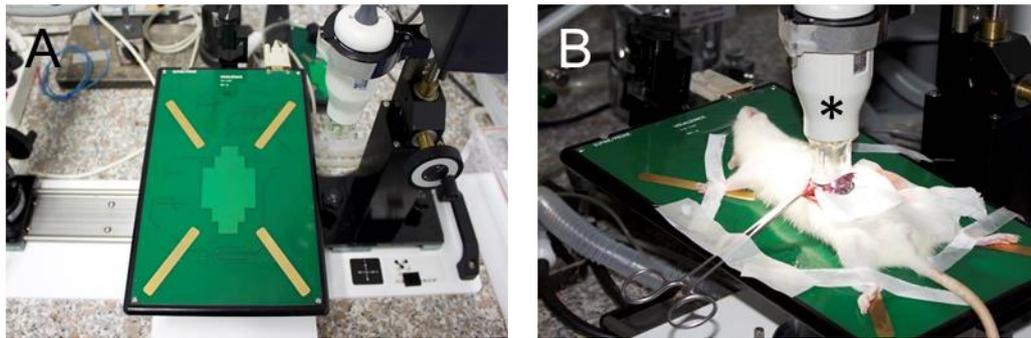


Abbildung 4: Versuchsaufbau der Ultraschalluntersuchung zur Messung des Tumorumfangs. Übersichtsaufnahme des Ultraschalltisches (A) und beispielhafte Ultraschalluntersuchung eines Versuchstiers (B). Der Ultraschallkopf (*) wird dabei von einem Linearmotor über den gesamten Leberlappen gefahren.

Für die Ultraschalluntersuchungen wurde ein 704RMV (real-time micro-visualization) Ultraschallkopf (VisualSonics) mit einer Frequenz von 30MHz und einer Fokustiefe von 12,5mm verwendet. Um die dreidimensionalen Aufnahmen zu generieren, wurde der Ultraschallkopf (siehe * in Abb. 4B) mittels eines Linearmotors über die gesamte Länge des Leberlappens und den darin befindlichen Tumor gefahren (siehe Abb. 4A, 4B). Alle 50µm wurden parallele, zweidimensionale Ultraschallbilder angefertigt. Mit einer speziellen Software (Vevo770 V2.3.0, VisualSonics) konnten diese zweidimensionalen Bilder daraufhin zu einem dreidimensionalen Bildwürfel rekonstruiert und auf der Festplatte gespeichert werden (siehe Abb. 5).

Direkt im Anschluss daran wurden die Tiere versorgt und erwachten komplikationslos aus ihrer Narkose. Die Ultraschalldaten wurden daraufhin separat mit der Vevo770 System Software Version 2.3.0 von VisualSonics quantitativ am Computer analysiert. Hierbei wurde das Gesamtvolumen (in mm³) der einzelnen Tumore bestimmt, indem alle 400µm in definierten, parallelen Ebenen die Grenzen der Tumore umfahren wurden. Die Berechnung des Volumens und die dreidimensionale Darstellung der Tumorherde erfolgte durch die VisualSonics-Software (Laschke et al., 2010; Sperling et al., 2013).

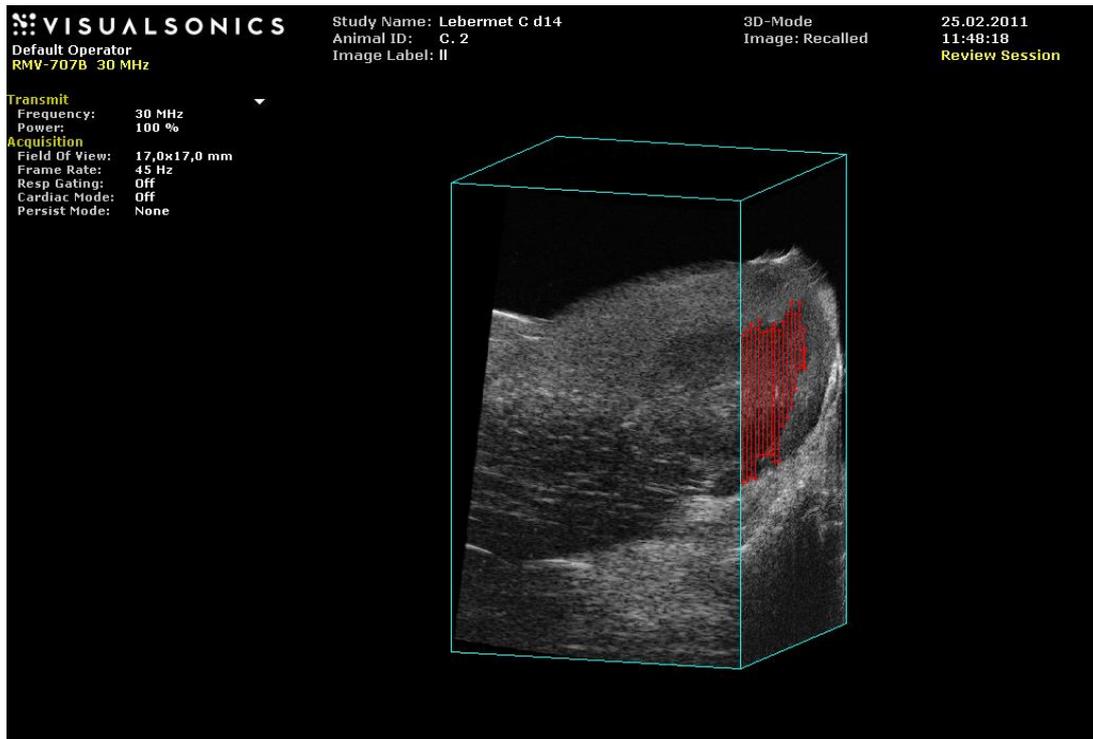


Abbildung 5: Dreidimensionale Rekonstruktion der zuvor gewonnenen zweidimensionalen Ultraschallbilder mittels der Software von Vevo770 V2.3.0 VisualSonics.

5.6 Mikrozirkulationsanalyse des Lebergewebes

Zur direkten Untersuchung der Mikrozirkulation kam die Laser-Doppler-Flow-Messung (LDF) zum Einsatz.

Für die Messung wurde eine Periflux® 5010 Unit mit einer Lasersonde (Perimed AB, Järfälla, Schweden) verwendet. Das Prinzip der LDF ist der Doppler-Effekt. Ähnlich wie beim Ultraschall werden vor allem Frequenzänderungen detektiert, die auftreten, wenn das ausgestrahlte Licht auf sich bewegende Teilchen, wie z.B. Erythrozyten trifft. Das reflektierte Licht wird in ein akustisches oder visuelles Signal umgewandelt, um so Änderungen der Mikrozirkulation zu erkennen. Dieses Signal entspricht hierbei einer Funktion aus Zahl und Geschwindigkeit der Blutkörperchen, die den Sondenbereich passieren, und wird als arbiträre perfusion units (au) ausgedrückt (Almond und Wheatley, 1992; Oberg, 1990). Eine Geschwindigkeit von 1mm/s bewirkt hierbei eine

Frequenzverschiebung von 4kHz (Goger, 2011). Messungen des Blutflusses – sowohl von großen Gefäßen als auch von Kapillaren – lassen sich mehrfach mit dieser Methode durchführen ohne dabei das Gewebe zu verletzen.

Die LDF-Messung des Lebergewebes wurde bei allen Tieren an Tag 14 vor der Organentnahme am LLL hilusnah durchgeführt. Für die Durchführung dieser Messungen wurde eine Halterung mit Feinjustierung der Sonde verwendet. Nach Präparation wurden die restlichen Leberlappen durch schwarze Folie isoliert, um dann eine LDF-Messung des zuvor definierten Gewebeabschnitts für jeweils 10 Sekunden durchzuführen. Somit war gewährleistet, dass immer nur die Mikrozirkulation des jeweiligen Gewebeabschnitts gemessen wurde. Pro Untersuchung wurden immer 10 Messwerte erfasst und dokumentiert.

5.7 Histologie, Immunhistochemie und Western Blot

5.7.1 Probengewinnung und Gewebeaufbewahrung

Zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung wurde an Tag 14 des Versuchs die Leber entnommen und das so gewonnene Gewebe in 4%-igem Phosphat-gepuffertem Formalin (Carl Roth GmbH & Co. KG) für etwa 2 Tage fixiert. Das Lebergewebe wurde im Anschluss in Paraffinwachs (Granopent® „P“, Paraffin in Plättchen, Carl Roth GmbH & Co. KG) eingebettet. Dabei wurde zum einen Tumorgewebe aus dem LLL gewonnen und zum anderen normales Lebergewebe aus dem AC bzw. PC (siehe Abb. 3B). Analog dazu wurde Gewebe für die Proteinbestimmung mittels Western Blot entnommen. Das Gewebe für die Western Blot Untersuchung wurde in einem Aluminium-Röhrchen ohne Fixiermedium zunächst in Flüssigstickstoff bei -168°C schockgefroren, um es dann bei -80°C in einem Gefrierschrank (Ultima II, Revco, Kendro Laboratory Products) zu lagern.

5.7.2 Histologische Färbungen (HE und CAE)

Von den in Paraffinwachs eingebetteten Gewebeproben wurden 2µm dicke Schnitte angefertigt und auf einem Objektträger (Objektträger, ca. 76x26mm, geputzt/gebrauchsfertig, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, BRD) fixiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Schnitte entparaffiniert und jeweils mit AS-D Chlor-

Acetesterase (CAE) oder mit Hämatoxylin-Eosin (HE) für die histologische Untersuchung gefärbt. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

5.7.2.1 HE-Färbung

Der Grad der Vakuolisierung der Hepatozyten im normalen Lebergewebe wurde semi-quantitativ mit Hilfe eines Olympus BX60 Lichtmikroskops (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, BRD) bestimmt. Die Bestimmung der Vakuolisierung erfolgte dabei verblindet. Hierfür wurden jeweils 20 High Power Fields (HPF) pro Leberschnitt ausgewertet und die Vakuolisierung in Punkte von 0 bis 4 eingestuft (modifiziert nach Calabrese et al., 1997):

- 0 Punkte = kein Hinweis (0% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- 1 Punkt = leicht (0-10% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- 2 Punkte = mäßig (10-30% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- 3 Punkte = schwer (30-50% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- 4 Punkte = sehr schwer (>50% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)

Die Ergebnisse wurden dabei als semi-quantitativer score von 0 bis 4 analog zu der oben genannten Einstufung angegeben (vgl. Sperling, 2007).

Zusätzlich wurde mit Hilfe der HE-gefärbten Schnitte die Proliferation der Tumorzellen bestimmt. Pro Schnitt wurden hierbei insgesamt 20 HPFs mit Hilfe eines Olympus BX60 Lichtmikroskops ausgewertet. Die Anzahl der Mitose-Figuren wurde bestimmt und als Mitose-Figuren pro HPF angegeben (siehe Abb. 6C). Die Nekrose-Areale wurden innerhalb der kolorektalen Lebermetastasen bestimmt, um so Aufschluss über das Ausmaß der Tumornekrosen zu bekommen. Dazu wurden ebenfalls HE-gefärbte Schnitte von tumortragendem Lebergewebe verwendet. Mit Hilfe der Software cellSens Dimension (Olympus Deutschland GmbH) wurden die Tumorgrenzen und die nekrotischen Areale umfahren und die Flächen bestimmt (siehe Abb. 6E). Der Quotient nekrotischer Areale innerhalb des Tumors zu gesamter Tumorphäche wurde in Prozent angegeben.

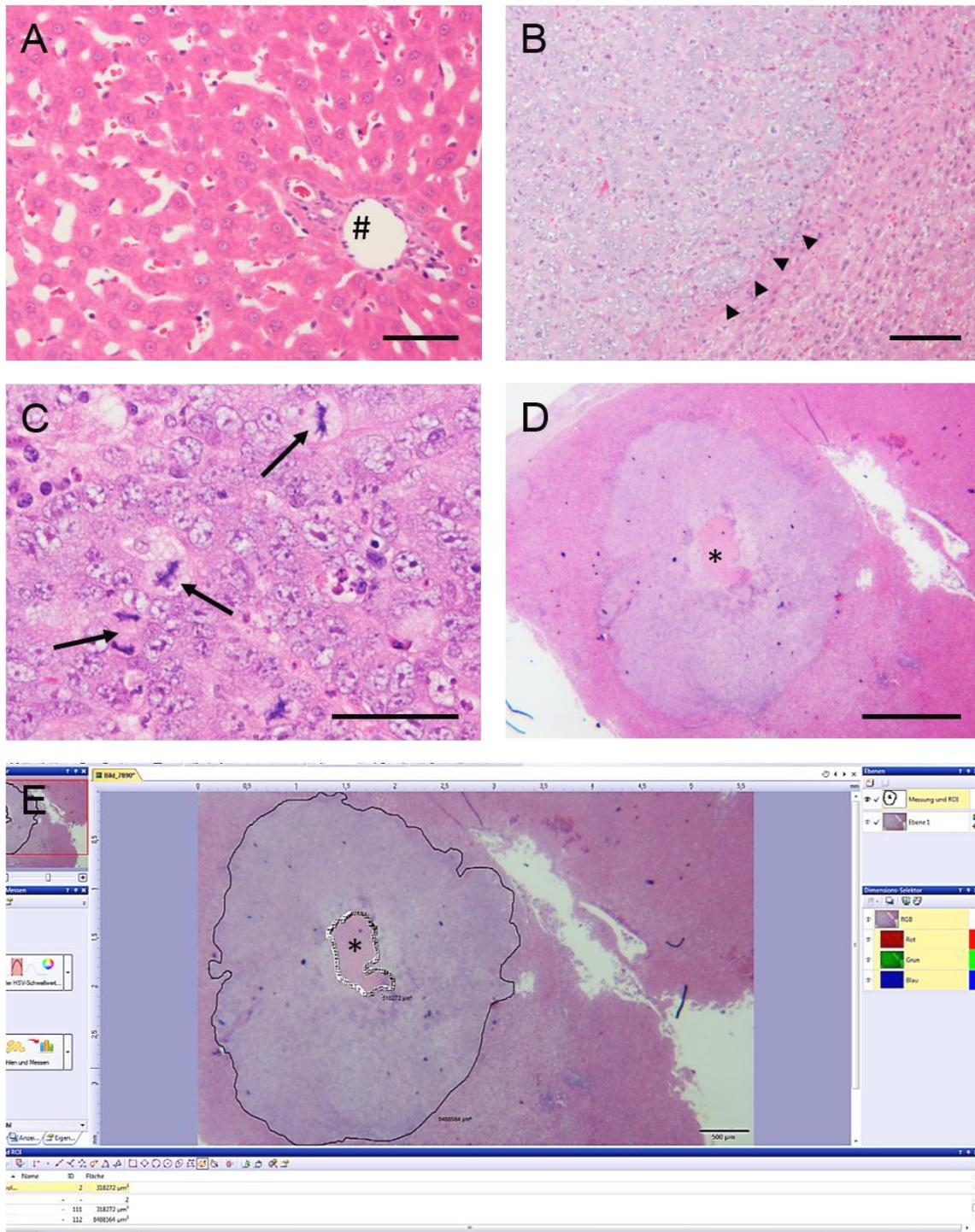


Abbildung 6: HE-gefärbte Schnitte von normalem Lebergewebe (A) mit einem Portalfeld (#) und Tumorgewebe (B-E) mit Tumorgrenze (Pfeilspitzen; B). Die HE-Färbung diente zur Ermittlung der Proliferation von Tumorzellen. Dabei wurden u.a. die Mitose-Figuren (Pfeile; C) im Tumorgewebe ausgezählt. Zusätzlich wurden die Nekrose-Areale (*; D und E) in den kolorektalen Metastasen bestimmt. Skalierung: 50µm (A und C), 100µm (B) und 1mm (D).

5.7.2.2 CAE-Färbung

Mit Hilfe der CAE-Färbung wurde die absolute Anzahl der Leukozyten, vor allem der neutrophilen Granulozyten, im normalen Lebergewebe in verschiedenen Leberarealen der jeweiligen Schnitte bestimmt. Dabei wurden für die intravasale Leukozytenakkumulation im normalen Lebergewebe in 10 portalen HPFs die intravasalen, CAE-positiven Zellen ausgezählt. Für die Leukozytenextravasation wurden jeweils in 10 periportal HPFs und 20 parenchymatösen HPFs die extravasalen, CAE-positiven Zellen gezählt (siehe Abb. 7).

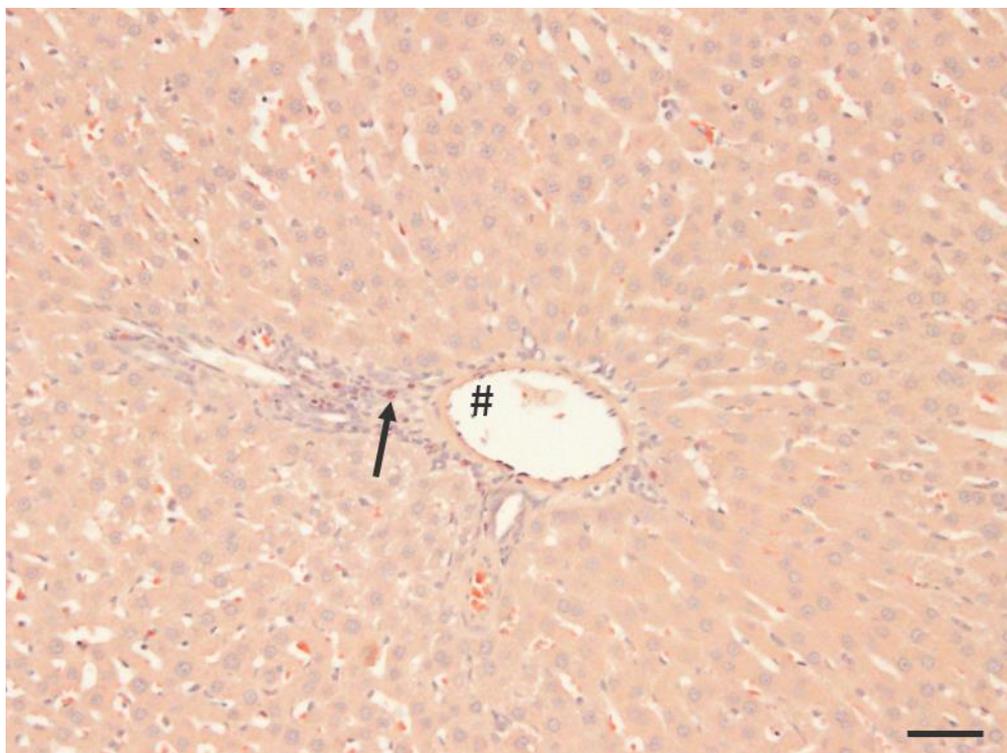


Abbildung 7: CAE-gefärbter Schnitt von normalem Lebergewebe. Ein Portalfeld (#) und periportal extravasiierte Leukozyten (Pfeil) sind zu sehen. Skalierung: 50 μ m.

5.7.3 Immunhistochemie (PCNA, Caspase-3 und PECAM-1)

5.7.3.1 PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

Zur Bestimmung der Proliferationsraten im normalen Lebergewebe und im Tumorgewebe wurde eine immunhistochemische PCNA-Färbung durchgeführt. Dazu wurden 2µm dünne Schnitte von den in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken angefertigt. Für 18h wurden diese Schnitte bei 4°C mit 1 ml PBS und dem polyklonalen IgG Primärantikörper „rabbit-anti-PCNA“ (75µl, Verdünnung 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, BRD) inkubiert.

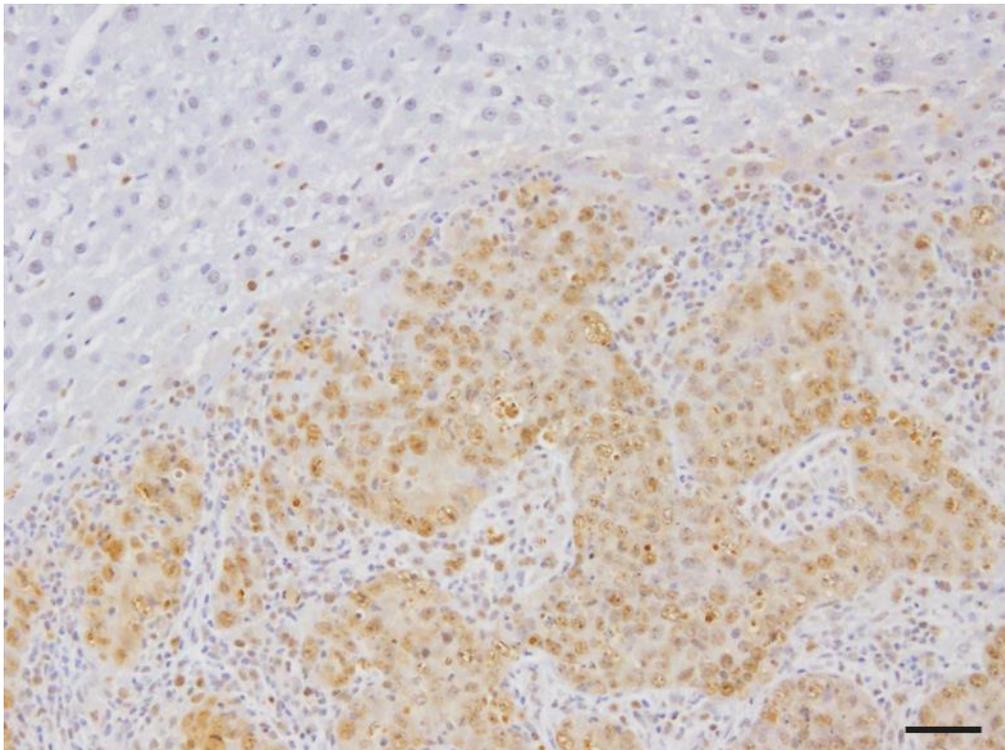


Abbildung 8: PCNA-gefärbter Schnitt von Tumorgewebe mit angrenzendem normalem Lebergewebe. Skalierung: 50µm.

Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper „goat-anti-rabbit-IgG“ (Verdünnung 1:20; Dako GmbH, Hamburg, BRD) für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Als Chromogen wurde 3,3`Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, BRD) verwendet.

Anschließend wurden die Schnitte mit Hämalaun n. Mayer (VWR, Darmstadt, BRD) gegengefärbt.

Pro Gewebeschnitt wurden 20 HPFs mit Hilfe eines Olympus BX60 Lichtmikroskops ausgewertet. Hierbei wurden sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl der PCNA-positiven Zellen bestimmt und als Prozent (Anzahl der PCNA-positiven Zellen in %) angegeben (siehe Abb. 8).

5.7.3.2 Caspase-3

Zur Bestimmung der Apoptoseraten im Tumorgewebe wurde eine immunhistochemische cleaved Caspase-3-Färbung durchgeführt. Dazu wurden ebenfalls 2µm dünne Schnitte von den in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken angefertigt. Die cleaved Caspase-3-Färbung erfolgte vergleichbar wie die PCNA-Färbung. Lediglich die verwendeten Antikörper und die Inkubation (über Nacht bei Raumtemperatur) unterschieden sich.

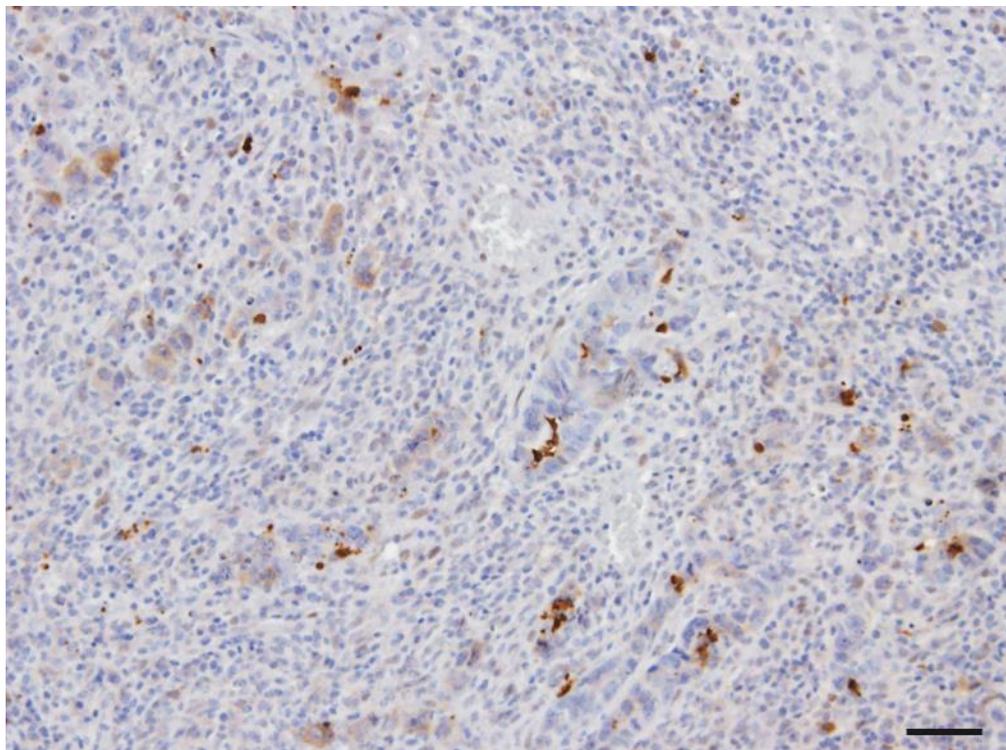


Abbildung 9: Cleaved Caspase-3-gefärbter Schnitt von Tumorgewebe. Skalierung: 50µm.

Der Primärantikörper war ein polyklonaler „rabbit-anti-cleaved-caspase-3“ Antikörper (20µl, Verdünnung 1:50, Cell Signaling Technology, Frankfurt, BRD). Als Sekundärantikörper wurde „goat-anti-rabbit-IgG“ Antikörper (100µl, Peroxidase-markiert, Verdünnung 1:100, Link, LSAB-HRP, Dako GmbH) verwendet.

Pro Schnitt wurden 20 HPFs mit Hilfe eines Olympus BX60 Lichtmikroskops ausgewertet. Hierbei wurden sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl der cleaved Caspase-3-positiven Zellen bestimmt und als Prozent (Anzahl der PCNA-positiven Zellen in %) angegeben (siehe Abb. 9).

5.7.3.3 PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)

Zur Bestimmung der Gefäßdichte im normalen Lebergewebe und im Tumorgewebe wurde eine immunhistochemische PECAM-1-Färbung durchgeführt. PECAM-1 (CD31) ist vor allem auf Endothelzellen zu finden, aber auch auf den Oberflächen von Blutplättchen, Monozyten und Neutrophilen wird PECAM-1 exprimiert. Dieses Molekül spielt demnach insbesondere eine Rolle bei der Angiogenese und der Leukozytenmigration (Newman et al., 1990).

Von den in Einbettungsmedium (Tissue Freezing Medium®, Jung, Leica Microsystems GmbH, Nussloch, BRD) kryokonservierten Gewebestücken wurden 2µm dünne Schnitte angefertigt. Als Primärantikörper wurde ein „mouse-anti-rat anti-PECAM-1-IgG“ Antikörper (Verdünnung 1:500; clone TLD-3 A12, Serotec, Düsseldorf, BRD) und als Sekundärantikörper ein „goat-anti-mouse-IgG“ Antikörper (Peroxidase-markiert, Verdünnung 1:100, Dianova, Hamburg, BRD) benutzt. Daraufhin wurden die Schnitte ebenfalls mit Hämalun n. Mayer gegengefärbt.

Pro Schnitt wurden insgesamt 30 HPFs (10 HPFs Tumorperipherie, 10 HPFs Tumorzentrum und 10 HPFs normales Lebergewebe) mit Hilfe eines Olympus BX60 Lichtmikroskops ausgewertet. Hierbei wurde die Anzahl der PECAM-1-positiven Zellen bestimmt und als PECAM-1-positive Zellen pro HPF angegeben.

5.7.4 Western Blot Analyse (VEGF und ICAM-1)

Zur Bestimmung der Expression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) nach Leberteilresektion im normalen Lebergewebe und im Tumorgewebe wurde eine Analyse mittels Western Blot durchgeführt.

Von den kryokonservierten Nativproben wurden 1mm bis 5mm große Gewebstücke unter Zusatz eines Proteinaseinhibitor-Cocktails (Verdünnung 1:75, Sigma-Aldrich GmbH) und 100mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Verdünnung 1:500, Carl Roth GmbH & Co. KG) zusammen in einem Low-Salt-Lysepuffer bestehend aus 10mM TRIS, pH 7,5, 10mM NaCl, 0,1mM EDTA, 0,5% Triton X 100 0,02% NaN₃ homogenisiert (Ultra Turrax T25, IKA Labortechnik, Staufen, BRD) (vgl. Slotta, 2006).

Nachdem die Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert wurden, erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 4°C mit 16.000xg (Biofuge fresco, Kendro, Hanau, BRD). Der Überstand (natives Protein) wurde im Anschluss abpipettiert. Das Pellet dagegen wurde nicht weiter verwendet und verworfen. Die gewonnenen Aliquots konnten nun zur Proteinbestimmung verwendet werden (vgl. Slotta, 2006).

In der vorliegenden Studie wurde die spektrophotometrische Methode nach Lowry verwandt, um die Proteinkonzentration zu bestimmen (Lowry et al., 1951). Somit konnte mittels Verdünnung durch destilliertes Wasser die Proteinkonzentration der Extrakte auf den gleichen Proteingehalt eingestellt werden. Nach der Zugabe von 2x „Sample Buffer“ nach Laemmli (Sigma-Aldrich GmbH) wurden die Extrakte für fünf Minuten in kochendem Wasser denaturiert. Danach erfolgte der Transfer der Extrakte in die Geltaschen (Konzentration 30µg/Bande).

Die Proteine trennten sich in einem SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel 5%, Trenngel 10%) elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht auf, zuerst bei einer Spannung von 100V für 15 Minuten im Sammelgel, dann bei 140V für eine Stunde im Trenngel. Dabei diente der „rainbow highrange Marker“ (GE Healthcare, Freiburg, BRD) als Molekulargewichtsstandard.

Die Equilibrierung der Gele für das folgende Membranblotting erfolgte nach Beendigung der Elektrophorese in einem Transferpufferbad. Der Transfer auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0,2µm, Polyvinylidenfluorid, Bio-Rad Laboratories, München,

BRD) erfolgte für eine Dauer von zwei Stunden in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (Bio-Rad Laboratories) bei einer Spannung von 50V unter Zugabe von Eis und ständigem Rühren (vgl. Slotta, 2006).

Eine Bindung des Primärantikörpers an unspezifische Bindungsstellen wurde verhindert, indem die Membranen mit einer 5% Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, Bio-Rad Laboratories) in TBS-T (Tris Buffered Saline Tween (Tween®20 Polyoxyethylenesorbitan monolaurats, Sigma-Aldrich GmbH)) für 30 Minuten inkubiert wurden. Nachdem einmal mit TBS-T gewaschen wurde, wurden die Primärantikörper aufgetragen und für 210 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert (siehe Tab. 1).

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden die Membranen mit den entsprechenden, in der Tabelle 1 aufgelisteten, Peroxidase (POD) markierten Sekundärantikörpern für 90 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen fünfmal mit TBS-T gewaschen und dann der Chemilumineszenzmethode (ECL (enhanced chemiluminescence), GE Healthcare) unterzogen. Zu Beginn erfolgte die Inkubation der Membranen für eine Minute in einem ECL Reagenz bei Raumtemperatur, im Anschluss wurden sie in Autoklavierfolie verpackt und zur Exposition auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) in einer Röntgenkassette positioniert. Für die Entwicklung wurden Zahnfilm-Reagenzien (Zahnfilm, Adefo GmbH, Nürnberg, BRD) verwendet (vgl. Slotta, 2006).

Die Röntgenfilme wurden mit Hilfe eines Gel-Dokumentationssystems (Gel Doc, Bio-Rad Laboratories) und eines Quantifizierungsprogrammes (Quantity One-Geldoc, Bio-Rad Laboratories) analysiert (vgl. Slotta, 2006).

| Primär-Antikörper | Ursprung | Verdünnung | Hersteller | Sekundärantikörper | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| VEGF | rabbit (polyklonal) | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology | donkey-anti-rabbit- IgG-POD | 1:5000 | GE Healthcare |
| ICAM-1 | goat (polyklonal) | 1:100 | R+D Systems, Wiesbaden, BRD | donkey-anti-goat- IgG-POD | 1:500 | Santa Cruz Biotechnology |

Table 1: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse.

5.8 Experimentelles Design

Zu Beginn des Versuchs wurden alle 28 WAG/Rij-Ratten randomisiert auf 4 Gruppen zu je 7 Tieren verteilt (siehe Abb. 10).

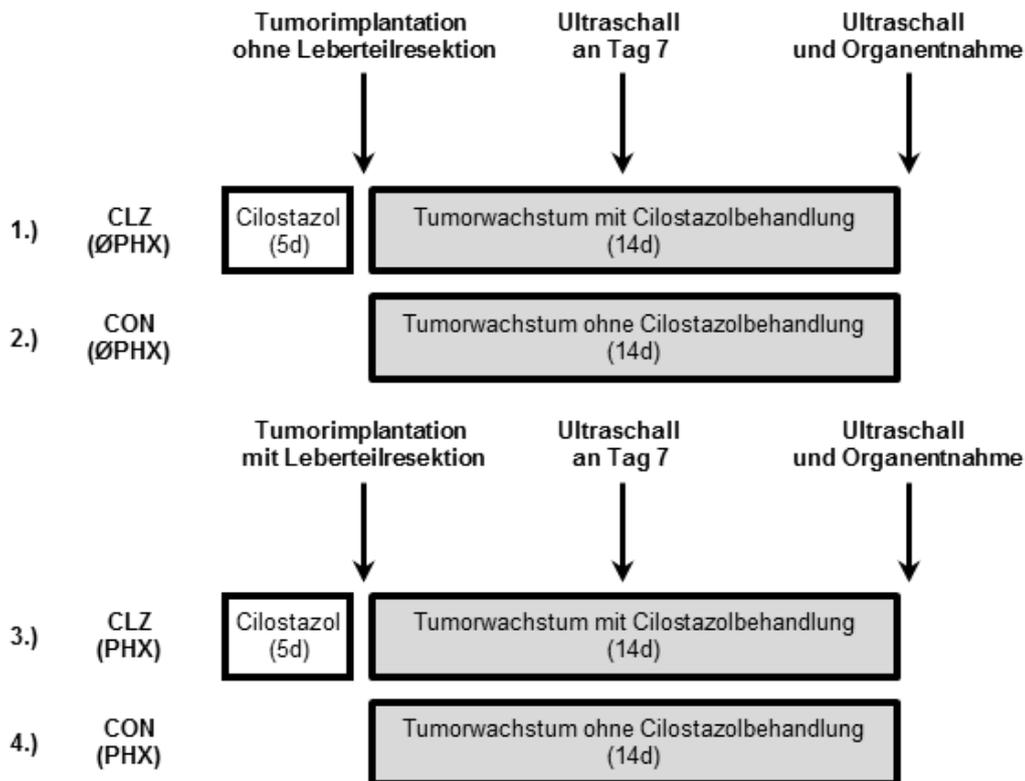


Abbildung 10: Versuchsprotokoll und zeitlicher Ablauf der Experimente ohne Leberteilresektion (ØPHX) und mit Leberteilresektion (PHX) der Vehikel-behandelten Tiere (CON) und Cilostazol-behandelten Tiere (CLZ). Dabei wurden anfangs 28 WAG-Ratten auf die 4 Gruppen randomisiert verteilt (n=7 pro Gruppe).

Die Hälfte der Tiere (n=14; CLZ) wurde einmal täglich für 5 Tage mit Cilostazol in einer Dosierung von 5mg/kg KG p.o. vorbehandelt. Die Behandlung (vgl. 5.4.2) mit Cilostazol dauerte bis zum Ende des Experiments (Tag 14 nach Tumorimplantation) an. Vehikel-behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n=14; CON). Nach 5 Tagen wurden bei der Hälfte der Cilostazol-behandelten bzw. der Vehikel-behandelten Tiere gemäß 5.4.3 Teile der Leber reseziert (jeweils n=7; CLZ PHX, CON PHX). Sham-operierte Tiere, d.h. Tiere, die nicht leberreseziert worden sind (jeweils n=7; CLZ ØPHX, CON ØPHX), dienten

als Kontrolltiere gegenüber der Leberteilektomie. Während derselben Operation wurde allen Tieren (n=28) subkapsulär die Tumormetastase eines kolorektalen Karzinoms implantiert (vgl. 5.4.4). Bei allen Tieren wurde an Tag 7 und Tag 14 das Tumolvolumen nach 5.5 mittels Ultraschall gemessen. Zudem wurde am Ende des Versuchs (Tag 14) durch LDF die Mikrozirkulation des links lateralen Leberlappens (LLL) jeder Ratte gemessen (vgl. 5.6). Anschließend wurde allen Versuchstieren die Leber für histologische und proteinbiochemische Untersuchungen entnommen. Das somit gewonnene Gewebematerial wurde nach 5.7.1 konserviert und analysiert.

5.9 Datenerfassung und Statistik

Direkt während der OP erhobene Daten wurden handschriftlich in ein Protokoll eingetragen. Später wurden diese Datensätze auf den Computer übertragen und in einem Tabellenkalkulationsprogramm zusammengefasst (Microsoft®Excel 2000, Microsoft Cooperation, USA).

Mittelwerte (MW) sowie Standardabweichung (SD) und Standardfehler der Mittelwerte (SEM, Standard error of the mean) konnten aus den so gewonnenen Datensätzen mit Hilfe von SigmaStat® Statistical Software, Version 2.03 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) ermittelt werden. Nach Untersuchung von Varianzgleichheit und Normalverteilung der Werte wurden die Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen mittels ANOVA (one-way analysis of variance) durchgeführt. Darauf folgte ein geeigneter post-hoc Test, welcher die Korrektur des alpha-Fehlers gemäß Bonferroni beinhaltete, um Mehrfachvergleiche zu kompensieren. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung der Software SigmaPlot® (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA) in Säulendiagrammen als absolute oder prozentuale Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes ($MW \pm SEM$). Die einzelnen Versuchsgruppen wurden mittels Student's t-Test für unverbundene Stichproben verglichen. Sobald die Werte nicht normalverteilt waren, wurde anstelle des Student's t-Testes ein Mann-Whitney U-Test verwendet. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden Unterschiede als signifikant anerkannt.

6 Ergebnisse

6.1 Hepatozelluläre Vakuolisierung

Zur Bestimmung der Zellmorphologie im normalen Lebergewebe 14 Tage nach Tumorimplantation erfolgte eine histologische Untersuchung.

Tiere ohne Leberteilresektion

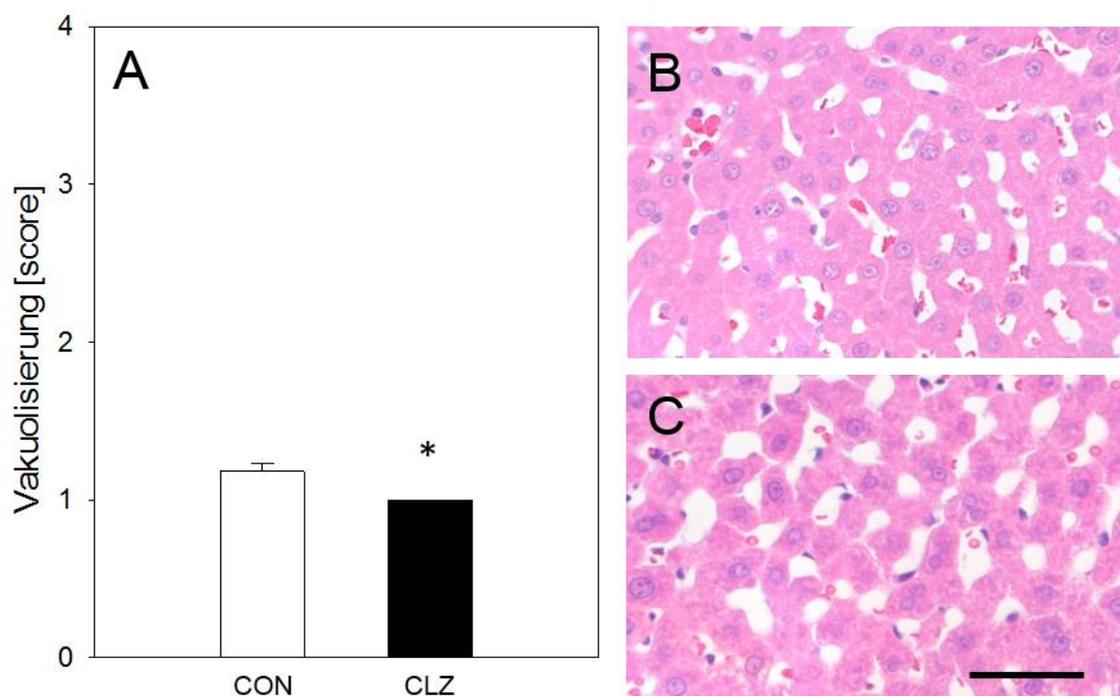


Abbildung 11: Semi-quantitative Bestimmung der zellulären Vakuolisierung mittels HE-Färbung an Tag 14 nach Tumorimplantation. Dabei wurde normales Lebergewebe von Tieren ohne Leberteilresektion (A; Vakuolisierung) verwendet. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (A; □; CON) oder eine Cilostazol-Behandlung (A; ■; CLZ). HE-Färbung von normalem Lebergewebe von Tieren ohne Leberteilresektion (B, C), die entweder einer Vehikel- (B) oder einer Cilostazol-Behandlung (C) unterzogen wurden. Score: Zellen mit Vakuolisierung >50% (4 Punkte), 30-50% (3 Punkte), 10-30% (2 Punkte), 0-10% (1 Punkt) und 0% (0 Punkte). Skalierung: 50µm. Mittelwert ± SEM. * $p < 0,05$ vs. CON.

Die semiquantitative Bestimmung der Vakuolisierung zeigte keine Hinweise auf eine zelluläre Schädigung im normalen Lebergewebe weder bei Vehikel-behandelnten

Tieren noch bei Cilostazol-behandelten Tieren (siehe Abb. 11A). Die Vakuolisierung der Hepatozyten in den mit Cilostazol-behandelten Tieren war sogar signifikant geringer als die Vakuolisierung der Hepatozyten der Vehikel-behandelten Tiere (siehe Abb. 11A-C).

Tiere mit Leberteilresektion

Auch nach Leberteilresektion zeigten sich im normalen Lebergewebe keine Hinweise auf eine Schädigung der Hepatozyten weder von Vehikel-behandelten noch von Cilostazol-behandelten Tieren (siehe Abb. 12A).

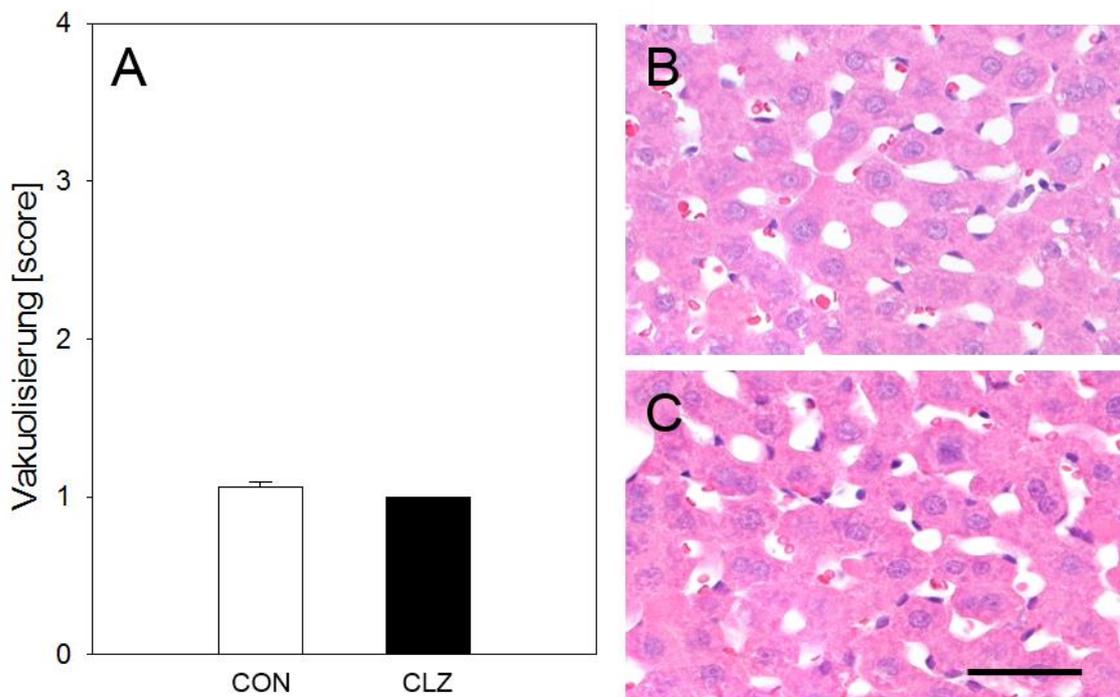


Abbildung 12: Semi-quantitative Bestimmung der zellulären Vakuolisierung mittels HE-Färbung an Tag 14 nach Tumorimplantation. Dabei wurde normales Lebergewebe von Tieren nach Leberteilresektion (A; Vakuolisierung) verwendet. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (A; □; CON) oder eine Cilostazol-Behandlung (A; ■; CLZ). HE-Färbung von normalem Lebergewebe von Tieren nach Leberteilresektion (B, C), die entweder einer Vehikel- (B) oder einer Cilostazol-Behandlung (C) unterzogen wurden. Score: Zellen mit Vakuolisierung >50% (4 Punkte), 30-50% (3 Punkte), 10-30% (2 Punkte), 0-10% (1 Punkt) und 0% (0 Punkte). Skalierung: 50µm. Mittelwert ± SEM.

Die Abbildungen 12B und 12C von HE-gefärbten normalen Leberschnitten veranschaulichen zudem, dass kein signifikanter Unterschied in der hepatozellulären

Vakuolisierung zwischen Cilostazol-behandelten Tieren (12C) und Vehikel-behandelten Tieren (12B) bestand.

6.2 Tumorwachstum

6.2.1 Systemische Auswirkungen der Tumorzellinjektion

Die subkapsuläre Injektion der Tumorzellen in die Leber verlief bei allen dafür vorgesehenen Tieren komplikationslos. Unter Isoflurannarkose fanden sich bei keinem Tier respiratorische oder kardiale Funktionseinschränkungen. Auch in der postoperativen Phase wurden keine Veränderungen der Herz-Kreislauf- und Atemfunktion festgestellt. Während der 14-tägigen Tumorwachstumsphase zeigte keines der Tiere Auffälligkeiten im Fress- und Trinkverhalten oder Verhaltensabweichungen. Die Wundheilung erfolgte bei allen Tieren per primam. Bis zur Relaparatomie blieb das Körpergewicht der Ratten weitestgehend konstant oder nahm minimal zu. Systemische Effekte, z.B. Atembeschwerden, bedingt durch das Tumorwachstum, wurden nicht beobachtet. An Tag 14 nach Tumorimplantation zeigten alle Tiere einen kugelförmigen Lebertumor von 5-10mm Durchmesser. Extrahepatische oder intraperitoneale Metastasen durch Tumorzellaussaat fanden sich bei keinem der Tiere.

6.2.2 Tumolvolumen

Tiere ohne Leberteileresektion

Die Bestimmung des Tumorwachstums der singulären Lebermetastasen erfolgte an Tag 7 und 14 nach Tumorimplantation durch eine Analyse der Tumolvolumina mittels Ultraschall. Die Tumolvolumina an Tag 7 der Vehikel-behandelten Tiere waren vergleichbar mit denen der Cilostazol-behandelten Tiere (CON: $24,1 \pm 8,4$ vs. CLZ: $23,0 \pm 6,3 \text{ mm}^3$). An Tag 14 waren die Tumolvolumina der Vehikel-behandelten Tiere und der Cilostazol-behandelten Tiere ebenfalls nur minimal unterschiedlich (CON: $145,2 \pm 44,7$ vs. CLZ: $126,2 \pm 28,8 \text{ mm}^3$) (siehe Abb. 13A-C). An beiden Tagen war der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Cilostazol-Behandlungsgruppe statistisch nicht signifikant (Tag 7: $p=0,916$ und Tag 14: $p=0,727$).

Die Tumorumfänge stiegen um das 5- bis 6-fache zwischen Tag 7 und Tag 14 sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach Cilostazolbehandlung an (siehe Abb. 13A). Dieser Anstieg war in beiden Gruppen statistisch signifikant (CON: $p=0,007$ und CLZ: $p=0,002$).

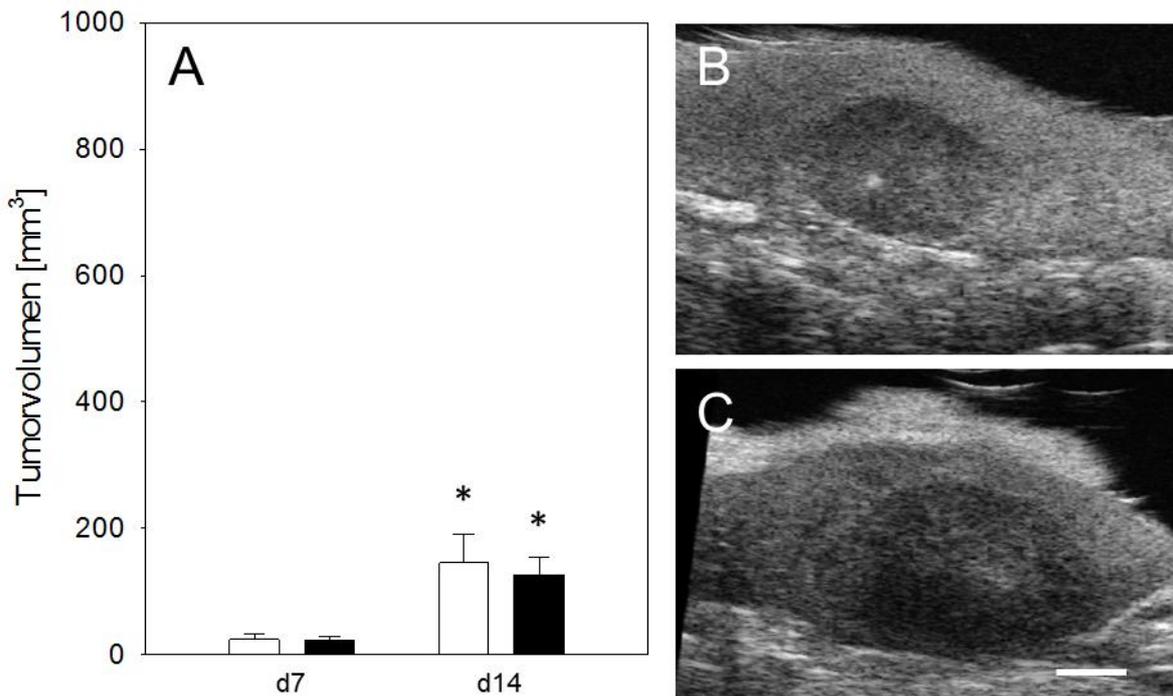


Abbildung 13: Volumetrische Bestimmung der singulären Lebermetastasen mittels 3D-Ultraschallanalyse an Tag 7 und 14 nach Tumorimplantation in Tieren ohne Leberresektion (A; in mm^3). Dabei erfolgte jeweils eine Vehikel- (A; □) oder eine Cilostazol-Behandlung (A; ■). Hochauflösende Ultraschallbilder der singulären Lebermetastasen an Tag 14 (B, C), entweder ohne Cilostazol- (B), oder mit Cilostazol-Behandlung (C). Skalierung: 2mm. Mittelwert \pm SEM. * $p<0,05$ versus d7.

Tiere mit Leberteileresektion

Mit Leberteileresektion zeigten alle Tiere ein 2- und 4-fach erhöhtes Tumorumfang an Tag 7 und Tag 14 nach Tumorimplantation im Vergleich zu Tieren ohne Leberteileresektion (vgl. Abb. 13A und 14A). Dabei ergab die statistische Auswertung der Tumorumfänge von leberresezierten Tieren im Vergleich zu nicht resezierten Tieren an den Tagen 7 und 14 jedoch keine signifikanten Unterschiede (Tag 7: $p=0,197$ (CON) und $p=0,249$ (CLZ); Tag 14: $p=0,169$ (CON) und $p=0,115$ (CLZ)).

Die Tumorumfänge an Tag 7 der Vehikel-behandelten Tiere waren vergleichbar mit denen der Cilostazol-behandelten Tiere (CON: $43,7 \pm 11,6$ vs. CLZ: $43,2 \pm 16,5$ mm³). An Tag 14 waren die Tumorumfänge der Vehikel-behandelten Tiere erkennbar höher als die Tumorumfänge der Cilostazol-behandelten Tiere (CON: $516,2 \pm 270,0$ vs. CLZ: $402,7 \pm 160,1$ mm³) (siehe Abb. 14A-C). An beiden Tagen war der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Cilostazol-Behandlungsgruppe jedoch statistisch nicht signifikant (Tag 7: $p=0,980$ und Tag 14: $p=0,714$) (siehe Abb. 14A).

Zudem waren die Tumorumfänge der Vehikel-behandelten und Cilostazol-behandelten Tiere, die leberteilreseziert wurden, an Tag 14 um das 9,3- bis 12-fache erhöht im Vergleich zu Tag 7 (siehe Abb. 14A). Dieser Anstieg war in beiden Gruppen statistisch signifikant ($p=0,014$ (CON) und $p=0,002$ (CLZ)).

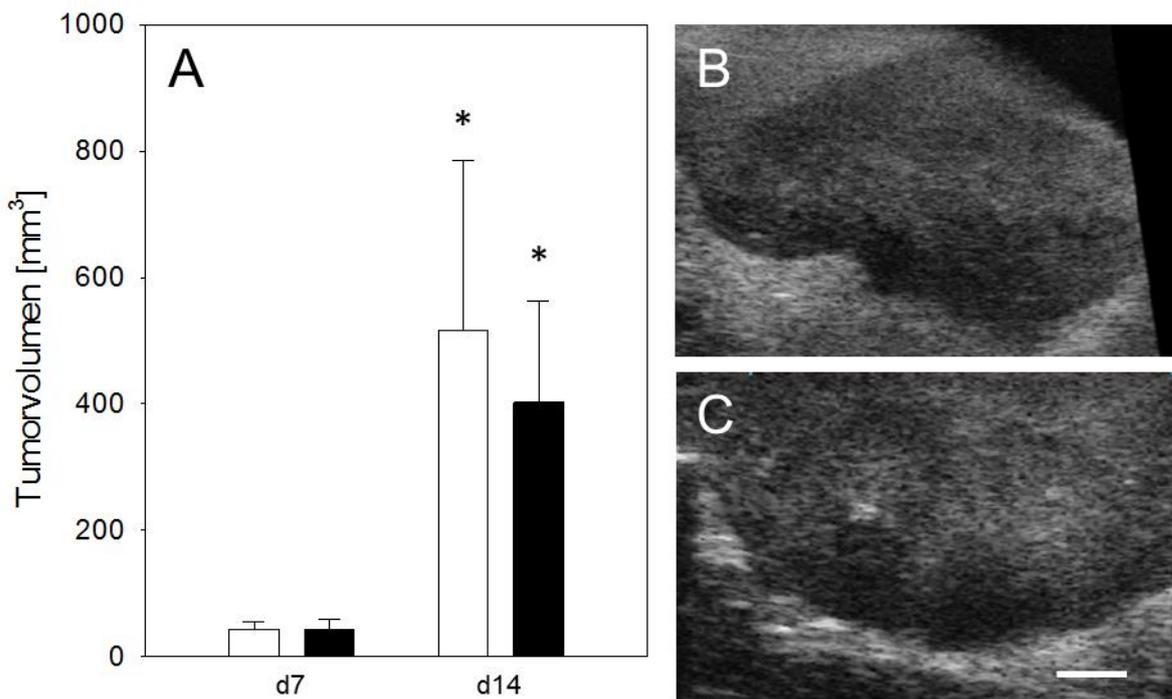


Abbildung 14: Volumetrische Bestimmung der singulären Lebermetastasen mittels 3D-Ultraschallanalyse an Tag 7 und 14 nach Tumorimplantation in Tieren nach Leberresektion (A; in mm³). Dabei erfolgte jeweils eine Vehikel- (A; □) oder eine Cilostazol-Behandlung (A; ■). Hochauflösende Ultraschallbilder der singulären Lebermetastasen an Tag 14 (B, C), entweder ohne Cilostazol- (B), oder mit Cilostazol-Behandlung (C). Skalierung: 2mm. Mittelwert ± SEM. * $p<0,05$ versus d7.

6.2.3 Tumorproliferation (PCNA-Färbung)

Zur Bestimmung der Zellproliferation im Tumor- und im normalen Lebergewebe an Tag 14 nach Tumorimplantation erfolgte eine immunhistochemische PCNA-Färbung.

Tiere ohne Leberteilresektion

Der Anteil an PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe betrug 66% in Vehikel-behandelten Tieren bzw. 60% in Cilostazol-behandelten Tieren und war damit etwa 10-fach höher als der Anteil an PCNA-positiven Zellen im normalen Lebergewebe.

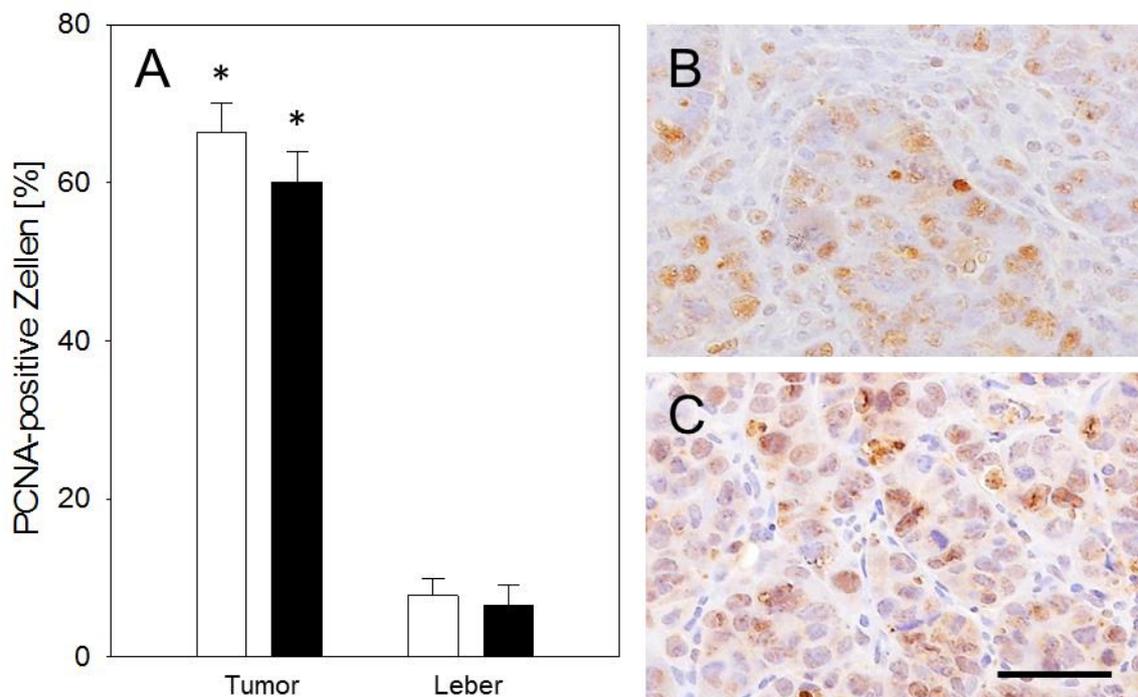


Abbildung 15: Immunhistochemische Bestimmung der Zellproliferation mittels PCNA-Färbung an Tag 14 nach Tumorimplantation. Dabei wurde Tumor- und Lebergewebe von Tieren ohne Leberteilresektion (A; % PCNA-positive Zellen) verwendet. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (A; □) oder eine Cilostazol-Behandlung (A; ■). Immunhistochemie von PCNA-gefärbtem Tumorgewebe von Tieren ohne Leberteilresektion (B, C), die entweder einer Vehikel- (B), oder einer Cilostazol-Behandlung (C) unterzogen wurden. Skalierung: 50µm. Mittelwert ± SEM. * $p < 0,001$ versus Leber.

Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von $< 0,001$ hoch signifikant (siehe Abb. 15A) und zeigt die erhöhte Proliferation der Tumorzellen, welche charakteristisch für einen

wachsenden Tumor ist. Dagegen war der Anteil an PCNA-positiven Zellen im normalen Lebergewebe von Cilostazol-behandelten Tieren vergleichbar zu dem der Vehikel-behandelten Kontrollgruppe (siehe Abb. 15A-C).

Tiere mit Leberteileresektion

Bei allen Tieren mit Leberteileresektion war sowohl im Tumorgewebe als auch im Lebergewebe der Anteil an PCNA-positiven Zellen um circa 10% erhöht verglichen mit Tieren, die nicht leberreseziert wurden (vgl. Abb. 15A und 16A).

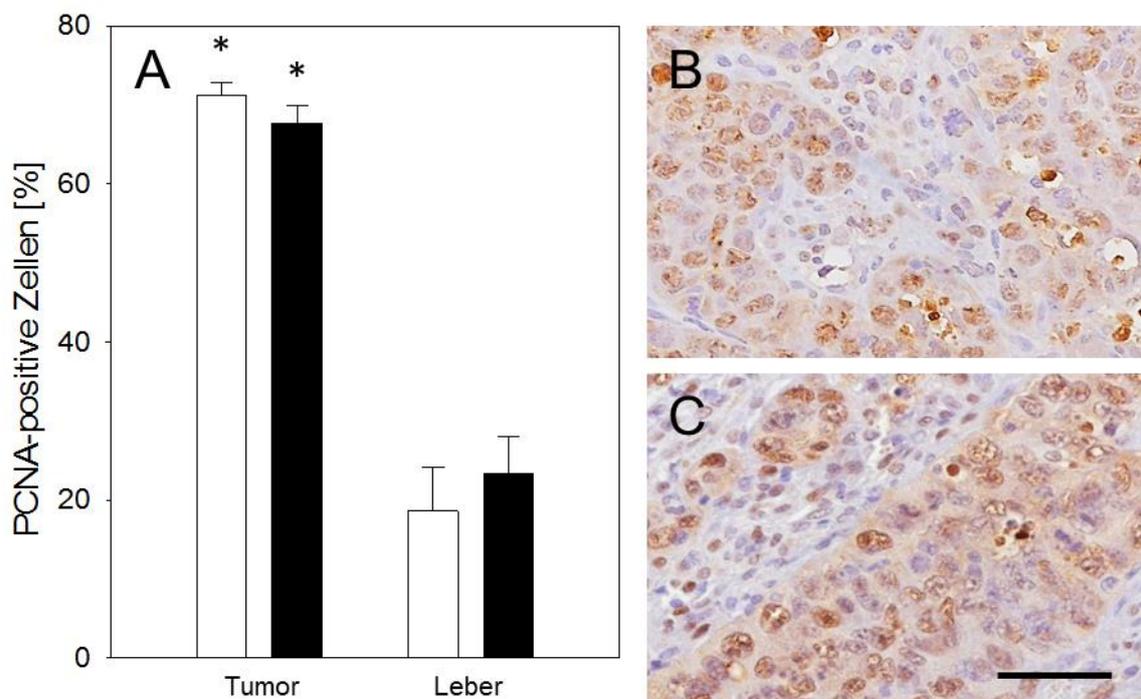


Abbildung 16: Immunhistochemische Bestimmung der Zellproliferation mittels PCNA-Färbung an Tag 14 nach Tumorimplantation. Dabei wurde Tumor- und Lebergewebe von Tieren nach Leberteileresektion (A; % PCNA-positive Zellen) verwendet. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (A; □) oder eine Cilostazol-Behandlung (A; ■). Immunhistochemie von PCNA-gefärbtem Tumorgewebe von Tieren nach Leberteileresektion (B, C), die entweder einer Vehikel- (B), oder einer Cilostazol-Behandlung (C) unterzogen wurden. Skalierung: 50µm. Mittelwert ± SEM. * $p < 0,001$ versus Leber.

Der Anteil an PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe betrug 71% in Vehikel-behandelten Tieren bzw. 68% in Cilostazol-behandelten Tieren und war damit etwa 3,5-

fach höher als der Anteil an PCNA-positiven Zellen im normalen Lebergewebe (siehe Abb. 16A). Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von $<0,001$ statistisch signifikant. Der Anteil an PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe und normalen Lebergewebe war zwischen der Kontrollgruppe und der Cilostazol-Behandlungsgruppe nicht signifikant unterschiedlich (siehe Abb. 16A-C).

6.2.4 Tumorproliferation (Mitose-Figuren)

Zusätzlich zu der immunhistochemischen PCNA-Färbung wurde mit Hilfe von HE-gefärbten Schnitten die Proliferation der Tumorzellen bestimmt. Dabei wurden die Mitose-Figuren pro HPF im Tumorgewebe an Tag 14 nach Tumorimplantation ausgewertet.

Tiere mit und ohne Leberteilresektion

Ohne Leberteilresektion war die Anzahl der Mitose-Figuren pro HPF etwas geringer im Tumorgewebe von Cilostazol-behandelten Tieren verglichen mit Vehikel-behandelten Tieren (CLZ: $0,49 \pm 0,07$ vs. CON: $0,74 \pm 0,16$ Mitose-Figuren/HPF). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

Nach Leberteilresektion war die Anzahl der Mitose-Figuren im Tumorgewebe von Vehikel-behandelten Tieren zwar höher ($0,95 \pm 0,17$ Mitose-Figuren pro HPF) (siehe Abb. 17A). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Die Anzahl von Mitose-Figuren pro HPF im Tumorgewebe von Cilostazol-behandelten Tieren war nach Leberteilresektion ebenfalls um ca. 50% erhöht. Diese Zunahme im Vergleich zum Wert ohne Leberteilresektion war statistisch signifikant ($p < 0,001$) (siehe Abb. 17A). Sowohl mit als auch ohne Leberteilresektion fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl von Mitose-Figuren im Tumorgewebe zwischen den Vehikel-behandelten Tieren und den Cilostazol-behandelten Tieren (siehe Abb. 17A).

Die Abbildungen 17B und 17C von HE-gefärbten Tumorschnitten veranschaulichen den signifikanten Unterschied in der Anzahl proliferierender Tumorzellen zwischen Cilostazol-behandelten Tieren ohne Leberteilresektion (siehe Abb. 17B) und Cilostazol-behandelten Tieren nach Leberteilresektion (siehe Abb. 17C).

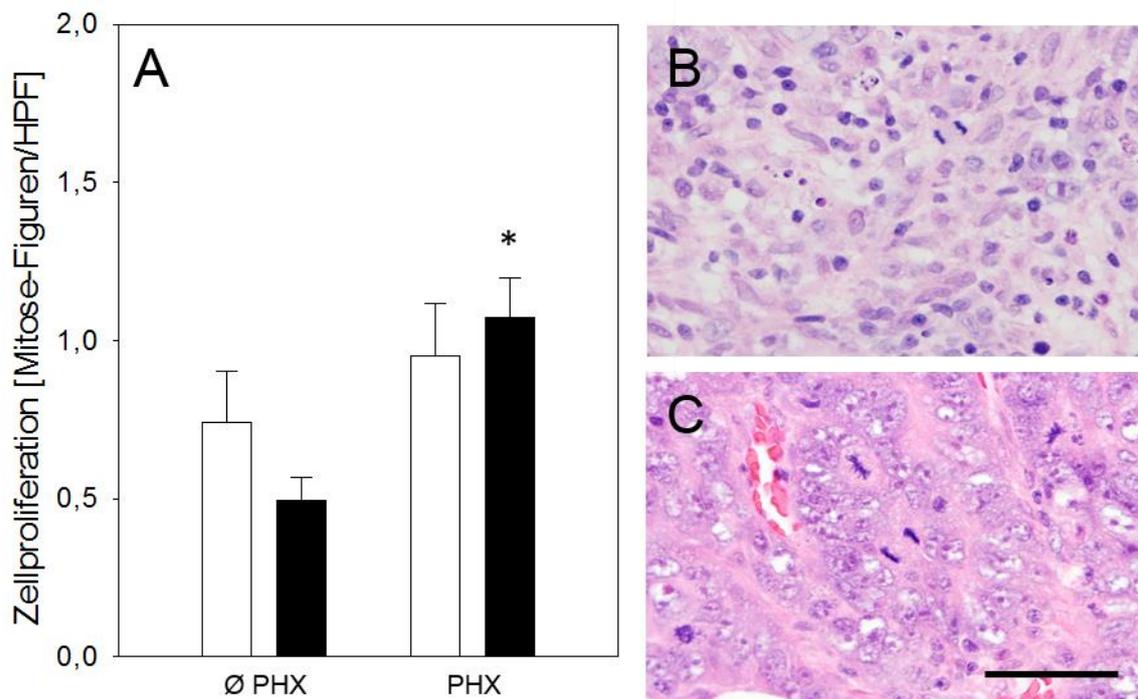


Abbildung 17: Histologische Bestimmung der Tumorzellproliferation mittels HE-Färbung an Tag 14 nach Sham-Operation (A, B; Ø PHX) oder Leberteilresektion (A, C; PHX). Dabei wurde die Anzahl der Mitose-Figuren pro HPF (A) im Tumorgewebe von Vehikel-behandelten (A; □; CON) und Cilostazol-behandelten Tieren (A-C; ■; CLZ) bestimmt. Skalierung: 50µm. Mittelwert ± SEM. * $p < 0.05$ versus Ø PHX.

6.2.5 Tumorapoptose

Zur Bestimmung der Apoptoseraten im Tumorgewebe an Tag 14 nach Tumorimplantation wurde eine immunhistochemische cleaved Caspase-3-Färbung durchgeführt.

Tiere mit und ohne Leberteilresektion

Ohne Leberteilresektion war der Anteil der cleaved Caspase-3-positiven Zellen im Tumorgewebe von Vehikel-behandelten Tieren 4,7% und von Cilostazol-behandelten Tieren 4,4%.

Nach Leberteilresektion war die Apoptoserate im Tumorgewebe von Vehikel-behandelten Tieren etwas höher (5,2% cleaved Caspase-3-positiven Zellen) (siehe Abb. 18A). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Anteil der cleaved Caspase-3-positiven Zellen im Tumorgewebe von Cilostazol-behandelten Tieren stieg mit Leberteilresektion von ca. 4,4% auf 6,0% an. Dieser Anstieg um 36% im Vergleich zum Wert ohne Leberteilresektion war statistisch signifikant ($p=0,015$) (siehe Abb. 18A). Sowohl mit als auch ohne Leberteilresektion fanden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl cleaved Caspase-3-positiver Zellen im Tumorgewebe zwischen den Vehikel-behandelten Tieren und den Cilostazol-behandelten Tieren (siehe Abb. 18A).

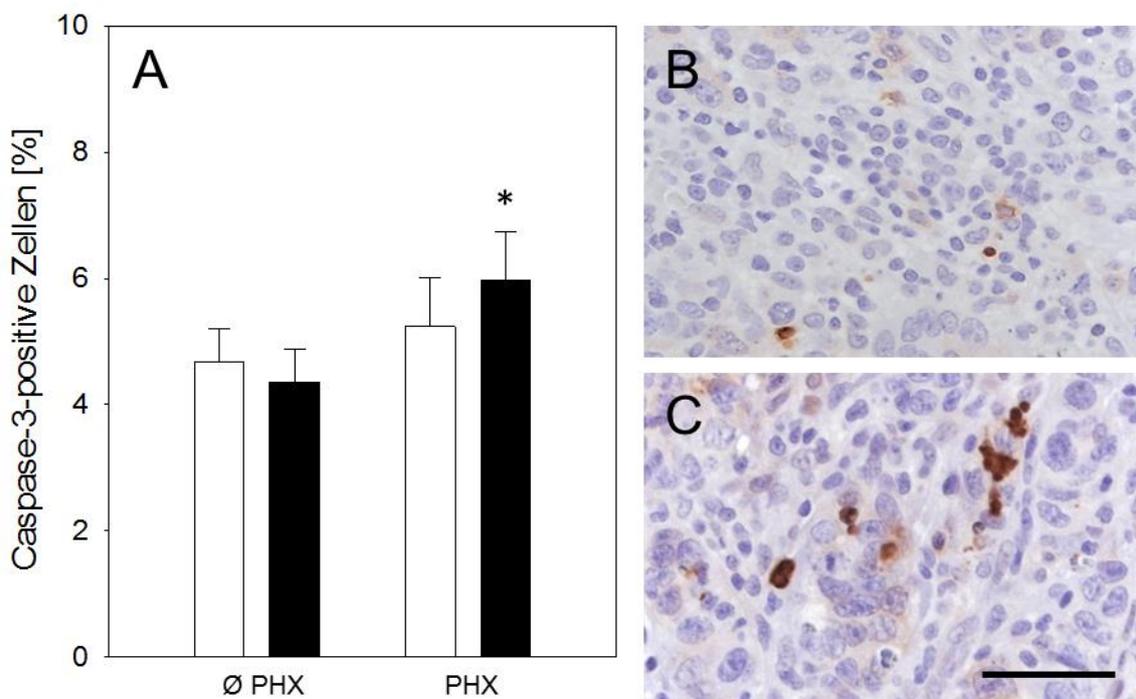


Abbildung 18: Immunhistochemische Bestimmung der Zellapoptose mittels cleaved Caspase-3-Färbung (in % cleaved Caspase-3-positiven Zellen) an Tag 14 nach Tumorimplantation. Dabei wurde Tumorgewebe von Tieren ohne Leberteilresektion (A; Ø PHX) oder nach Leberteilresektion (A; PHX) verwendet. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (A; □) oder eine Cilostazol-Behandlung (A; ■). Immunhistochemie von cleaved Caspase-3-gefärbtem Tumorgewebe von Tieren mit Cilostazol-Behandlung (B, C), die entweder einer Sham-Operation (B) oder einer Leberteilresektion (C) zugeführt wurden. Skalierung: 50µm. Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ versus Ø PHX.

Die Abbildungen 18B und 18C von cleaved Caspase-3-gefärbten Tumorschnitten veranschaulichen den signifikanten Unterschied in den Apoptoseraten der Tumorzellen

zwischen Cilostazol-behandelten Tieren ohne Leberteileresektion (siehe Abb. 18B) und Cilostazol-behandelten Tieren mit Leberteileresektion (siehe Abb. 18C).

6.2.6 Tumornekrose-Areale

Zur Bestimmung der Tumornekrose-Areale an Tag 14 nach Tumorimplantation wurde eine HE-Färbung verwendet.

Tiere mit und ohne Leberteileresektion

Ohne Leberteileresektion war der Anteil der Tumornekrose-Areale an der gesamten Tumorrofläche in Cilostazol-behandelten Tieren signifikant geringer ($p=0,008$) im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren. Dabei hatten Cilostazol-behandelte Tumore ca. 80% weniger Tumornekrose-Areale als Tumore von Vehikel-behandelten Tieren (CLZ: $0,84\% \pm 0,77\%$ vs. CON: $4,59\% \pm 1,10\%$ Tumornekrose-Areale).

Nach Leberteileresektion war der Anteil an Tumornekrose-Arealen im Tumorgewebe von Vehikel-behandelten Tieren überraschenderweise etwas geringer als im Tumorgewebe von Vehikel-behandelten Tieren ohne Leberteileresektion (siehe Abb. 19A). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Anteil an Tumornekrose-Arealen im Tumorgewebe von Cilostazol-behandelten Tieren war nach Leberteileresektion etwas höher verglichen zu den Tieren ohne Leberteileresektion (siehe Abb. 19A). Dieser Unterschied war ebenfalls statistisch nicht signifikant ($p=0,08$). Nach Leberteileresektion waren die Tumornekrose-Areale im Tumorgewebe von Vehikel-behandelten Tieren vergleichbar mit denen von Cilostazol-behandelten Tieren (siehe Abb. 19A).

Die Abbildungen 19B und 19C von HE-gefärbten Tumorschnitten veranschaulichen den signifikanten Unterschied in den Tumornekrose-Arealen zwischen Vehikel-behandelten Tieren ohne Leberteileresektion (siehe Abb. 19B; gestrichelte Linie) und Cilostazol-behandelten Tieren ohne Leberteileresektion (siehe Abb. 19C).

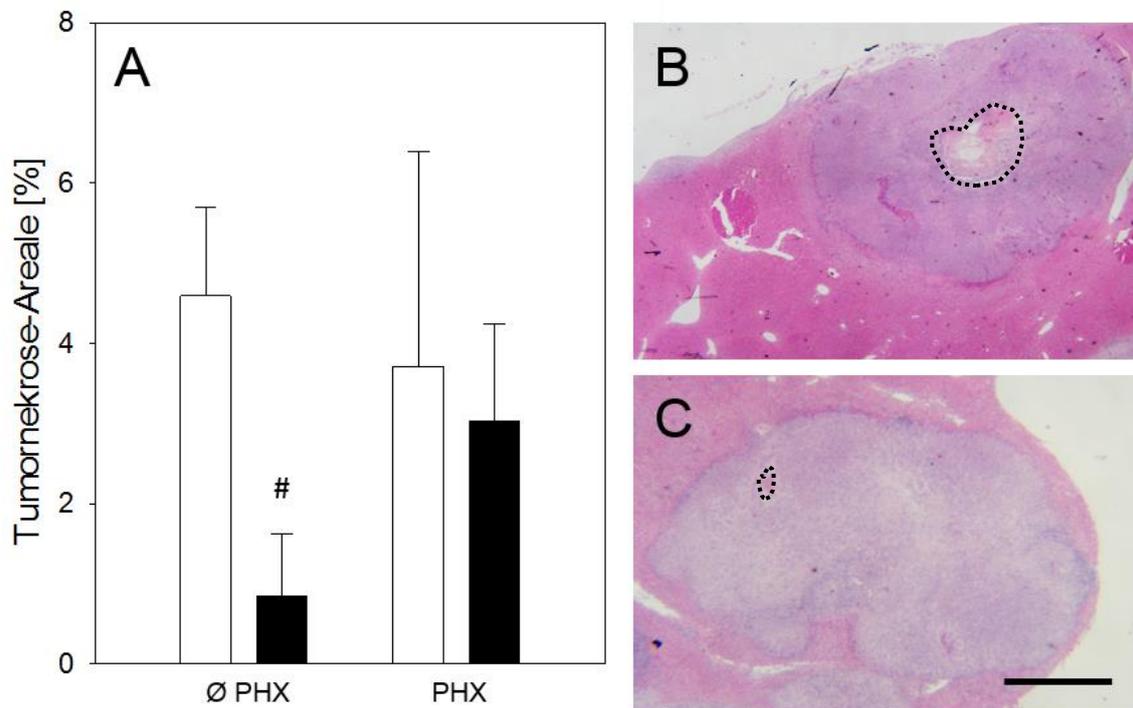


Abbildung 19: Histologische Bestimmung der Anteile der Tumornekrose-Areale (A in %; gestrichelte Linie in B, C) an der Tumorgesamtfläche mittels HE-Färbung an Tag 14 nach Sham-Operation (A-C; Ø PHX) oder Leberteilresektion (A; PHX). Dabei wurde Tumorgewebe von Vehikel-behandelten (A und B; □; CON) und von Cilostazol-behandelten Tieren (A und C; ■; CLZ) verwendet. HE-Färbung von Tumorgewebe von Tieren mit Sham-Operation (B, C), die entweder einer Vehikel- (B) oder einer Cilostazol-Behandlung (C) unterzogen wurden. Skalierung: 1mm. Mittelwert \pm SEM. # $p < 0.05$ versus CON.

6.3 Tumolvaskularisierung

6.3.1 Tumolvaskularisierung ohne Leberteilresektion

Zur Bestimmung der Vaskularisierung bzw. der Anzahl von Endothelzellen im Tumorgewebe und im normalen Lebergewebe an Tag 14 nach Tumorimplantation wurde eine immunhistochemische PECAM-1-Färbung verwendet.

Im normalen Lebergewebe war die Anzahl der PECAM-1-positiven Zellen in Vehikel-behandelten Tieren und Cilostazol-behandelten Tieren vergleichbar (siehe Abb.

20A). Dagegen hatten die Tumore von Cilostazol-behandelten Tieren eine signifikant geringere Anzahl an PECAM-1-positiven Endothelzellen sowohl im peripheren Tumorgewebe (CLZ: $4,2 \pm 1,0$ vs. CON: $16,0 \pm 5,0$ positive Zellen/HPF) als auch im zentralen Tumorgewebe (CLZ: $2,6 \pm 0,5$ vs. CON: $6,0 \pm 1,0$ positive Zellen/HPF) im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren (siehe Abb. 20A-C).

Die Anzahl der PECAM-1-positiven Zellen war bei Vehikel-behandelten Tieren im peripheren Tumorgewebe etwa 3-fach höher als im normalen Lebergewebe und im zentralen Tumorgewebe (Leber: $5,0 \pm 1,0$ vs. Tumor peripher: $16,0 \pm 5,0$ vs. Tumor zentral: $6,0 \pm 1,0$ positive Zellen/HPF). Der Unterschied in der Anzahl an PECAM-1-positiven Endothelzellen war jedoch nur zwischen peripherem Tumorgewebe und normalem Lebergewebe der Vehikel-behandelten Tiere statistisch signifikant (Leber vs. Tumor peripher: $p=0,008$). In Cilostazol-behandelten Tieren war der Unterschied in der Gefäßdichte zwischen peripherem Tumorgewebe und zentralem Tumorgewebe ebenfalls sichtbar, jedoch statistisch nicht signifikant (Tumor peripher: $4,2 \pm 1,0$ vs. Tumor zentral: $2,6 \pm 0,5$ positive Zellen/HPF; $p=0,196$). Dies spricht dennoch für eine hohe Vaskularisierung der Tumorperipherie in Vehikel-behandelten Tieren und Cilostazol-behandelten Tieren im Vergleich zum Tumorzentrum.

Die Abbildungen 20B und 20C von PECAM-1-gefärbten Tumorschnitten veranschaulichen, dass ohne Leberteilresektion ein deutlicher Unterschied in der Vaskularisierung der Tumorperipherie zwischen Vehikel-behandelten Tieren (siehe Abb. 20B) und Cilostazol-behandelten Tieren bestand (siehe Abb. 20C).

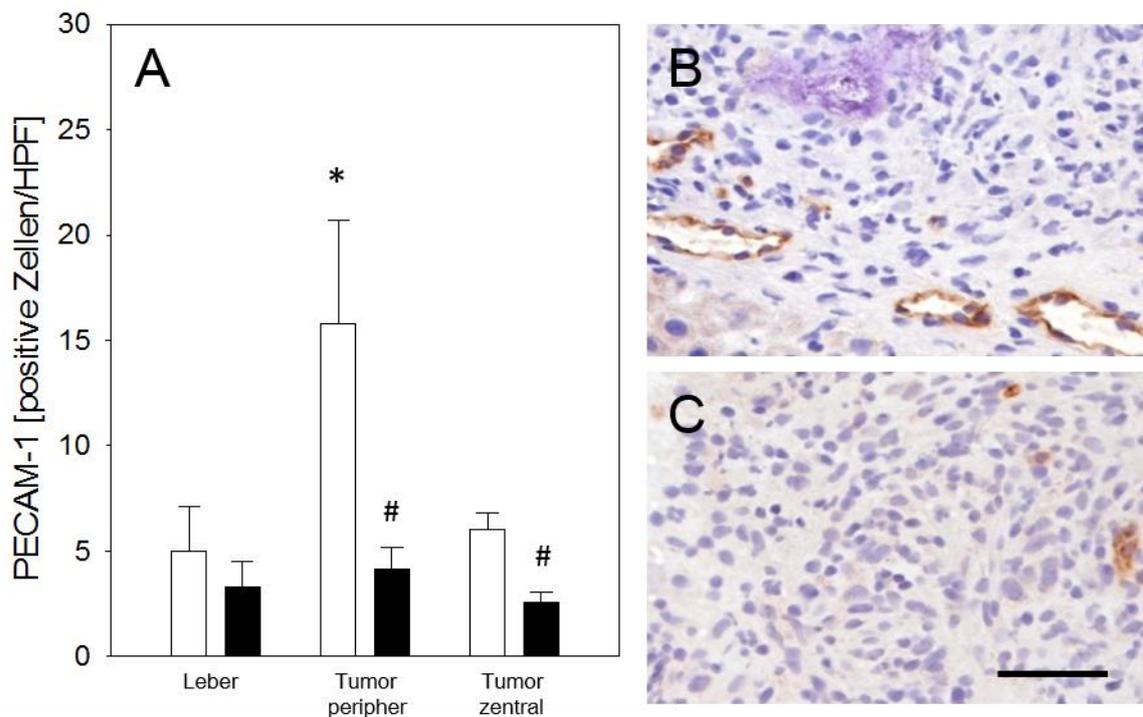


Abbildung 20: Immunhistochemische Bestimmung der Vaskularisierung mittels PECAM-1-Färbung an Tag 14 nach Tumorimplantation. Dabei wurde Tumor- und Lebergewebe von Tieren ohne Leberteilresektion (A; in PECAM-1-positive Zellen pro HPF) verwendet. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (A; □; CON) oder eine Cilostazol-Behandlung (A; ■; CLZ). Immunhistochemie von PECAM-1-gefärbtem peripherem Tumorgewebe von Tieren ohne Leberteilresektion (B, C), die entweder einer Vehikel- (B) oder einer Cilostazol-Behandlung (C) unterzogen wurden. Skalierung: 50µm. Mittelwert ± SEM. * $p < 0,05$ versus Leber. # $p < 0,05$ versus CON.

6.3.2 Tumolvaskularisierung mit Leberteilresektion

Im normalen Lebergewebe war die Anzahl der PECAM-1-positiven Zellen in Cilostazol-behandelten Tieren geringer im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren (CLZ: $2,3 \pm 0,7$ vs. CON: $7,0 \pm 1,0$ positive Zellen/HPF). Dieser Unterschied war jedoch trotz einer geringen SEM in der Cilostazol-Behandlungsgruppe statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 21A). Zudem hatten die Tumore von Cilostazol-behandelten Tieren eine signifikant geringere Anzahl an PECAM-1-positiven Endothelzellen im peripheren Tumorgewebe (CLZ: $3,7 \pm 0,8$ vs. CON: $19,0 \pm 2,0$ positive Zellen/HPF). Die Anzahl der PECAM-1-positiven Zellen war auch im zentralen Tumorgewebe von Cilostazol-behandelten Tieren (CLZ: $3,4 \pm 1,3$ positive Zellen/HPF) im Vergleich zu Vehikel-

behandelten Tieren (CON: $5,0 \pm 1,0$ positive Zellen/HPF) geringer (siehe Abb. 21A-C). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,181$).

Die Anzahl der PECAM-1-positiven Zellen war bei Vehikel-behandelten Tieren im peripheren Tumorgewebe etwa 3- bis 4-fach höher als im normalen Lebergewebe und im zentralen Tumorgewebe (Leber: $7,0 \pm 1,0$ vs. Tumor peripher: $19,0 \pm 2,0$ vs. Tumor zentral: $5,0 \pm 1,0$ positive Zellen/HPF). Diese Unterschiede waren in beiden Fällen signifikant (Leber vs. Tumor peripher: $p=0,001$ und Tumor peripher vs. Tumor zentral $p=0,002$) (siehe Abb. 21A).

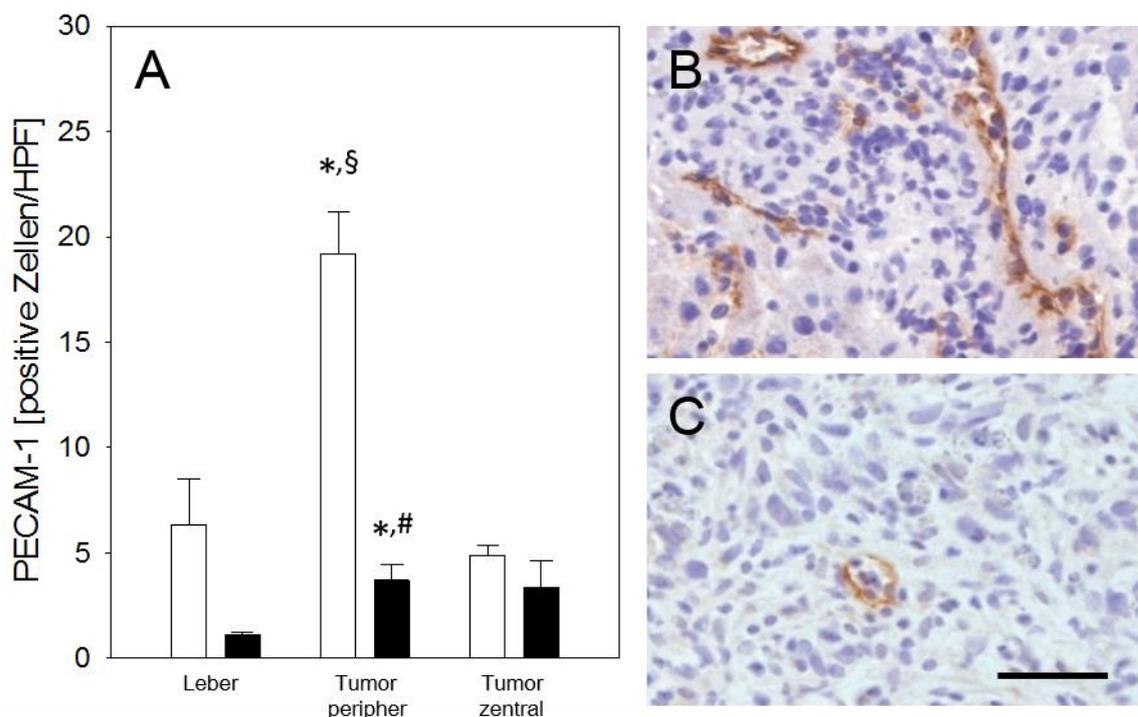


Abbildung 21: Immunhistochemische Bestimmung der Vaskularisierung mittels PECAM-1-Färbung an Tag 14 nach Tumorimplantation. Dabei wurde Tumor- und Lebergewebe von Tieren nach Leberteilresektion (A; in PECAM-1-positive Zellen pro HPF) verwendet. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (A; □; CON) oder eine Cilostazol-Behandlung (A; ■; CLZ). Immunhistochemie von PECAM-1-gefärbtem peripherem Tumorgewebe von Tieren nach Leberteilresektion (B, C), die entweder einer Vehikel- (B) oder einer Cilostazol-Behandlung (C) unterzogen wurden. Skalierung: 50µm. Mittelwert \pm SEM. * $p<0,05$ versus Leber. # $p<0,001$ versus CON. § $p<0,05$ versus Tumor zentral.

In Cilostazol-behandelten Tieren war der Unterschied in der Verteilung der Gefäßdichte vor allem zwischen Tumorperipherie und Tumorzentrum geringer

ausgeprägt. Dennoch war in Cilostazol-behandelten Tieren die Anzahl der PECAM-1-positiven Endothelzellen im peripheren Tumorgewebe verglichen mit dem normalen Lebergewebe deutlich erhöht (Tumor peripher: $3,7 \pm 0,8$ vs. Leber: $1,1 \pm 0,1$ positive Zellen/HPF). Die statistische Auswertung ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied (Leber vs. Tumor peripher: $p=0,226$). Dennoch spricht dieser Unterschied in der Gefäßdichte ebenfalls für eine hohe Vaskularisierung der Tumorperipherie in Vehikel-behandelten Tieren und Cilostazol-behandelten Tieren (siehe Abb. 21A).

Die Abbildungen 21B und 21C von PECAM-1-gefärbten Tumorschnitten veranschaulichen, dass mit Leberteilektomie ein deutlicher Unterschied in der Vaskularisierung der Tumorperipherie zwischen Vehikel-behandelten Tieren (siehe Abb. 21B) und Cilostazol-behandelten Tieren bestand (siehe Abb. 21C).

6.3.3 Vergleich Tumolvaskularisierung mit und ohne Leberteilektomie

Nach Leberteilektomie war die Tumolvaskularisierung bestimmt durch PECAM-1-Färbung sowohl im Tumorgewebe als auch im normalen Lebergewebe von Vehikel-behandelten Tieren und Cilostazol-behandelten Tieren etwas höher im Vergleich zu Tieren ohne Leberteilektomie. Dieser geringe Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (vgl. Abb. 20A und 21A).

6.3.4 VEGF-Expression

Zur Bestimmung der VEGF-Expression im Tumorgewebe und im normalen Lebergewebe an Tag 14 nach Tumorumplantation und Leberteilektomie wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt.

Die VEGF-Expression im Tumorgewebe von Cilostazol-behandelten Tieren war deutlich höher als im Tumorgewebe von Vehikel-behandelten Tieren. Die statistische Auswertung zeigte jedoch, dass dieser Unterschied nicht signifikant war ($p=0,133$). Die Analyse der VEGF-Expression im normalen Lebergewebe zeigte ebenfalls eine etwas höhere Expression in Cilostazol-behandelten Tieren im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren. Hierbei ergab die statistische Auswertung einen p-Wert von 0,030 und damit einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (siehe Abb. 22C).

In Vehikel-behandelten Tieren war die VEGF-Expression im Tumorgewebe deutlich erhöht verglichen mit der VEGF-Expression im normalen Lebergewebe (siehe Abb. 22C). Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von 0,018 statistisch signifikant. Auch in Cilostazol-behandelten Tieren zeigte sich eine Erhöhung der VEGF-Expression im Tumorgewebe verglichen mit der VEGF-Expression im normalen Lebergewebe. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant (siehe Abb. 22C).

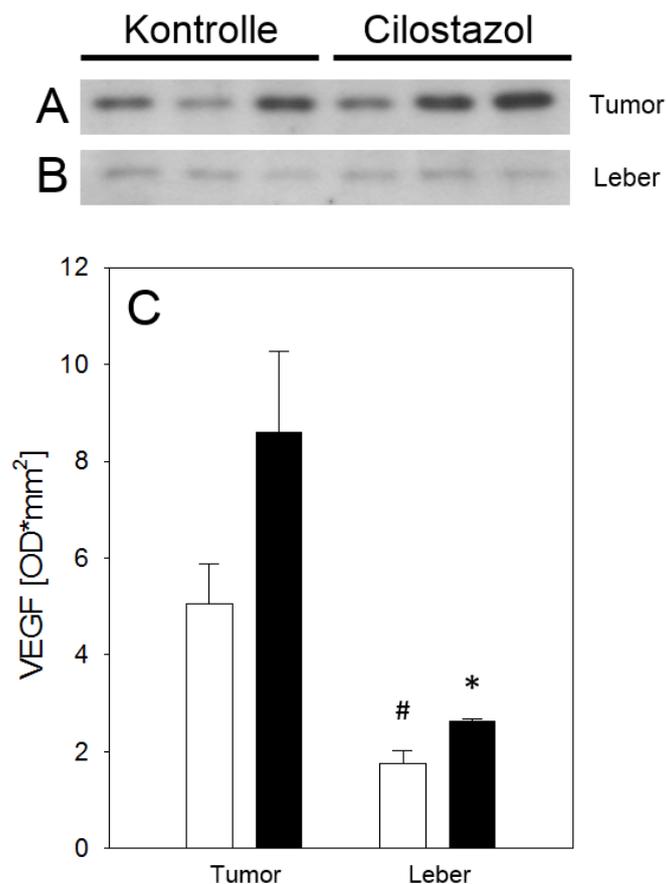


Abbildung 22: Bestimmung der VEGF-Expression mittels Western Blot (A, B) und densitometrischer Analyse (C) an Tag 14 nach Tumorimplantation in Tumorgewebe (A, C) und normalem Lebergewebe (B, C) von Tieren nach Leberteileresektion. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (Kontrolle: A, B; C; □; CON) und eine Cilostazol-Behandlung (Cilostazol: A, B; C; ■; CLZ). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ versus CON. # $p < 0,05$ versus Tumor.

6.4 Mikrozirkulationsanalyse des Lebergewebes

Die Mikrozirkulation der Leber wurde mittels Laser Doppler Flowmetrie (LDF) an Tag 14 nach Tumorimplantation im normalen Lebergewebe bestimmt.

Tiere mit und ohne Leberteilresektion

Ohne Leberteilresektion war die Leberperfusion in Cilostazol-behandelten Tieren signifikant um 157aU erhöht im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren (siehe Abb. 23). Mit Leberteilresektion fand sich ebenfalls eine signifikant erhöhte Leberperfusion in Cilostazol-behandelten Tieren verglichen mit Vehikel-behandelten Tieren (siehe Abb. 23). Dabei war mit Leberteilresektion die Leberperfusion im normalen Lebergewebe von Cilostazol-behandelten Tieren um 141aU, also um das 1,4 fache, höher als die Leberperfusion im normalen Lebergewebe von Vehikel-behandelten Tieren (siehe Abb. 23).

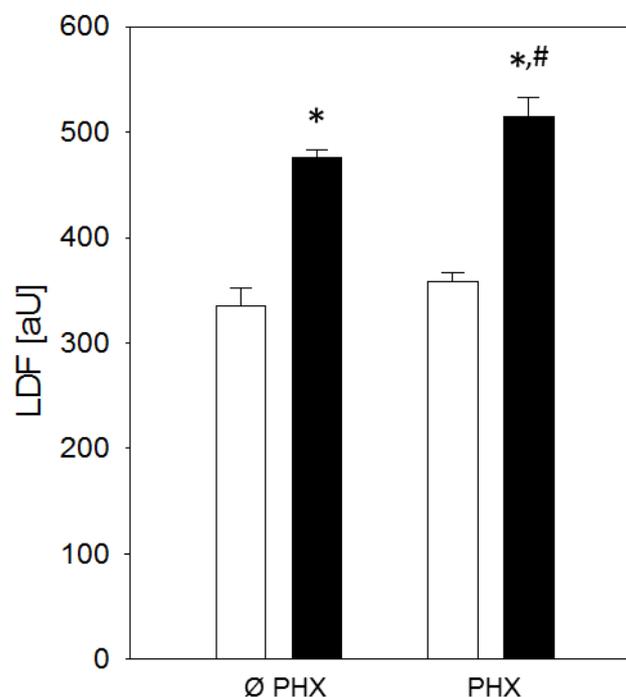


Abbildung 23: Mikrozirkulationsbestimmung im normalen Lebergewebe mittels LDF (in aU) an Tag 14 nach Tumorimplantation in Vehikel-behandelten Tieren (□; CON) und Cilostazol-behandelten Tieren (■; CLZ). Es fand entweder eine Sham-Operation (Ø PHX) oder eine Leberteilresektion (PHX) statt. Mittelwert ± SEM. * $p < 0.05$ versus CON. # $p < 0,05$ versus Ø PHX.

In Vehikel-behandelten Tieren mit Leberteilresektion war die Leberperfusion nur geringfügig erhöht im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren ohne Leberteilresektion. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. In Cilostazol-behandelten Tieren mit Leberteilresektion war die Leberperfusion dagegen signifikant erhöht verglichen zu Cilostazol-behandelten Tieren ohne Leberteilresektion (siehe Abb. 23).

6.5 Leukozytenakkumulation

6.5.1 Portale, intravasale Leukozytenakkumulation

Zur Bestimmung der intravasalen Leukozytenakkumulation in den Portalfeldern des normalen Lebergewebes an Tag 14 nach Tumorimplantation wurde eine CAE-Färbung verwendet.

Tiere ohne Leberteilresektion

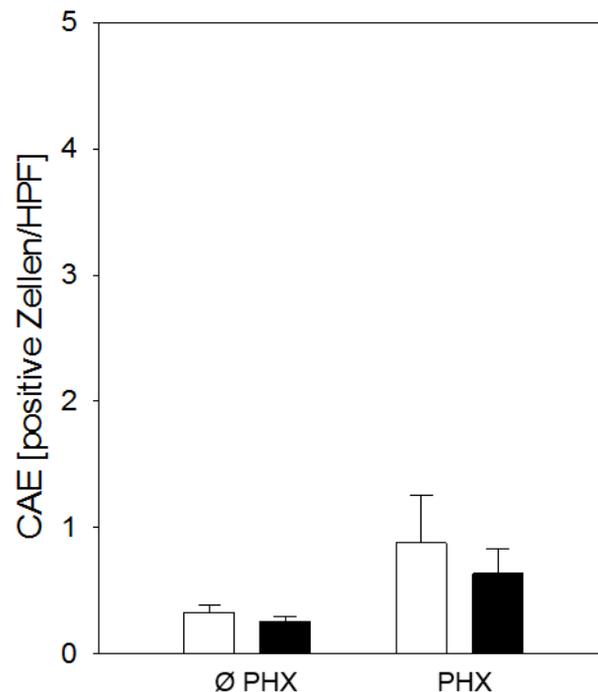


Abbildung 24: Histologische Bestimmung der intravasalen Leukozytenanzahl in den Portalfeldern mittels CAE-Färbung an Tag 14 nach Tumorimplantation (in CAE-positive Zellen pro HPF). Dabei wurde normales Lebergewebe von sham-operierten Tieren (Ø PHX) und leberresezierten Tieren (PHX) verwendet. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (□; CON) oder eine Cilostazol-Behandlung (■; CLZ). Mittelwert \pm SEM.

Im normalen Lebergewebe konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an CAE-positiven Zellen innerhalb der Gefäße der Portalfelder zwischen Vehikel-behandelten Tieren und Cilostazol-behandelten Tieren festgestellt werden (siehe Abb. 24).

Tiere mit Leberteilresektion

Nach Leberteilresektion stieg die Anzahl der CAE-positiven Zellen innerhalb der Gefäße der Portalfelder in der Vehikel-behandelten Gruppe und in der Cilostazol-behandelten Gruppe leicht an. Dieser Anstieg war mit p-Werten von 0,145 (CON) und 0,087 (CLZ) jedoch statistisch nicht signifikant (siehe. Abb. 24).

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an CAE-positiven Zellen innerhalb der Gefäße der Portalfelder zwischen Vehikel-behandelten Tieren und Cilostazol-behandelten Tieren festgestellt werden (siehe Abb. 24).

6.5.2 Periportale Leukozytenextravasation

Tiere ohne Leberteilresektion

Zwischen den Gefäßen der Portalfelder fanden sich im normalen Lebergewebe von Cilostazol-behandelten Tieren ca. 50% weniger CAE-positive Zellen als im normalen Lebergewebe von Vehikel-behandelten Tieren ($1,2 \pm 0,2$ (CLZ) vs. $2,6 \pm 0,3$ (CON) positive Zellen/HPF). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,015$) (siehe Abb. 26). Die Abbildungen 25A und 25B von CAE-gefärbtem normalem Lebergewebe verdeutlichen repräsentativ, dass ohne Leberteilresektion ein deutlicher Unterschied in der periportalen Leukozytenanzahl zwischen Vehikel-behandelten (siehe Abb. 25A) und Cilostazol-behandelten Tieren bestand (siehe Abb. 25B).

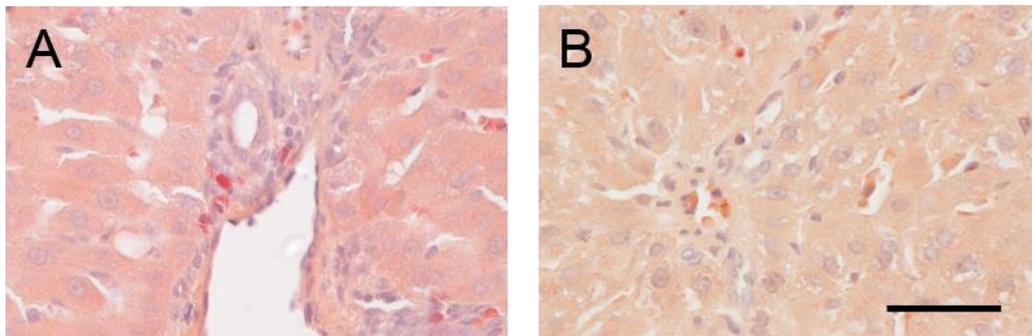


Abbildung 25: Histologie von CAE-gefärbtem Lebergewebe an Tag 14 nach Tumorimplantation von Tieren ohne Leberteilresektion (A, B). Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (A) oder eine Cilostazol-Behandlung (B). Skalierung: 50 μ m.

Tiere mit Leberteilresektion

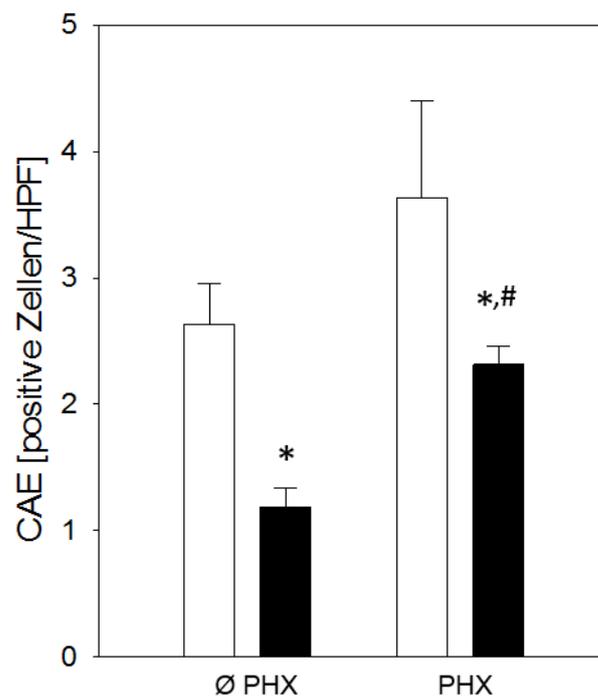


Abbildung 26: Histologische Bestimmung der periportalen Leukozytenanzahl mittels CAE-Färbung an Tag 14 nach Tumorimplantation (in CAE-positive Zellen pro HPF). Dabei wurde normales Lebergewebe von sham-operierten Tieren (Ø PHX) und leberresezierten Tieren (PHX) verwendet. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (□; CON) oder eine Cilostazol-Behandlung (■; CLZ). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ versus CON. # $p < 0,05$ versus Ø PHX.

Nach Leberteilresektion stieg die Anzahl der CAE-positiven Zellen zwischen den Gefäßen der Portalfelder im normalen Lebergewebe von Vehikel-behandelten Tieren und von Cilostazol-behandelten Tieren an. Gleichwohl war dieser Unterschied nur im normalen Lebergewebe der Cilostazol-behandelten Tiere signifikant (siehe Abb. 26).

Die Anzahl der CAE-positiven Zellen zwischen den Gefäßen der Portalfelder war bei den Cilostazol-behandelten Tieren um ca. 35% verringert verglichen zu den Vehikel-behandelten Tieren ($2,3 \pm 0,1$ (CLZ) vs. $3,6 \pm 0,8$ (CON) positive Zellen/HPF). Dieser Unterschied in der Anzahl CAE-positiver Zellen zwischen den beiden Gruppen war mit einem p-Wert von $p=0,004$ statistisch signifikant (siehe Abb. 26).

Die Abbildungen 27A und 27B von CAE-gefärbtem normalem Lebergewebe verdeutlichen repräsentativ, dass nach Leberteilresektion ein deutlicher Unterschied zwischen der periportalen Leukozytenanzahl in Vehikel-behandelten (siehe Abb. 27A) gegenüber Cilostazol-behandelten Tieren bestand (siehe Abb. 27B).

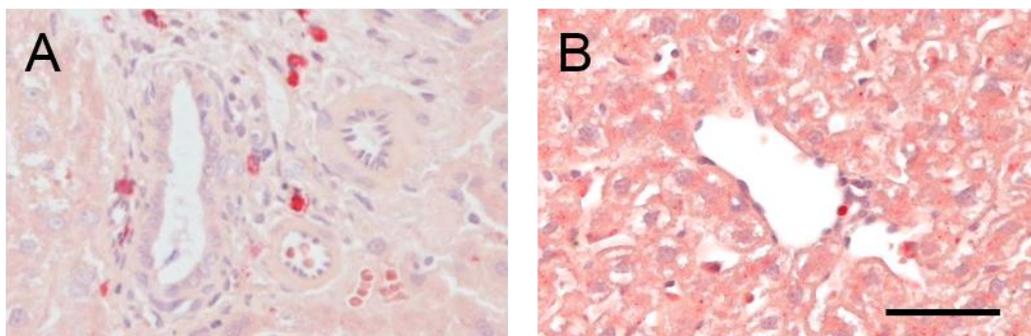


Abbildung 27: Histologie von CAE-gefärbtem Lebergewebe an Tag 14 nach Tumorimplantation von Tieren mit Leberteilresektion (A, B). Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (A) oder eine Cilostazol-Behandlung (B). Skalierung: $50\mu\text{m}$.

6.5.3 Parenchymatöse Leukozytenextravasation

Tiere ohne Leberteilresektion

Im normalen Lebergewebe konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an CAE-positiven Zellen im Leberparenchym zwischen Vehikel-behandelten Tieren und

Cilostazol-behandelten Tieren festgestellt werden (siehe Abb. 28).

Tiere mit Leberteileresektion

Nach Leberteileresektion stieg die Anzahl der CAE-positiven Zellen im Leberparenchym von Vehikel-behandelten Tieren und Cilostazol-behandelten Tieren leicht an (siehe Abb. 28). Dieser Anstieg war jedoch statistisch nicht signifikant. Zwischen Vehikel-behandelten Tieren und Cilostazol-behandelten Tieren konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an CAE-positiven Zellen im normalen Leberparenchym festgestellt werden (siehe Abb. 28).

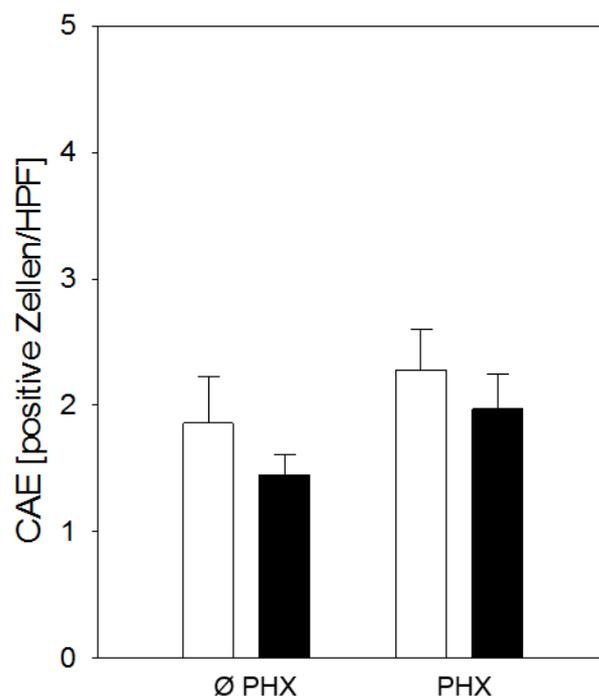


Abbildung 28: Histologische Bestimmung der parenchymatösen Leukozytenanzahl mittels CAE-Färbung an Tag 14 nach Tumorimplantation (in CAE-positive Zellen pro HPF). Dabei wurde normales Lebergewebe von sham-operierten Tieren (Ø PHX) und leberresezierten Tieren (PHX) verwendet. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (□; CON) oder eine Cilostazol-Behandlung (■; CLZ). Mittelwert \pm SEM.

6.5.4 ICAM-1-Expression

Zur Bestimmung der ICAM-1-Expression im Tumorgewebe und im normalen Lebergewebe an Tag 14 nach Tumorimplantation und Leberteileresektion wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt.

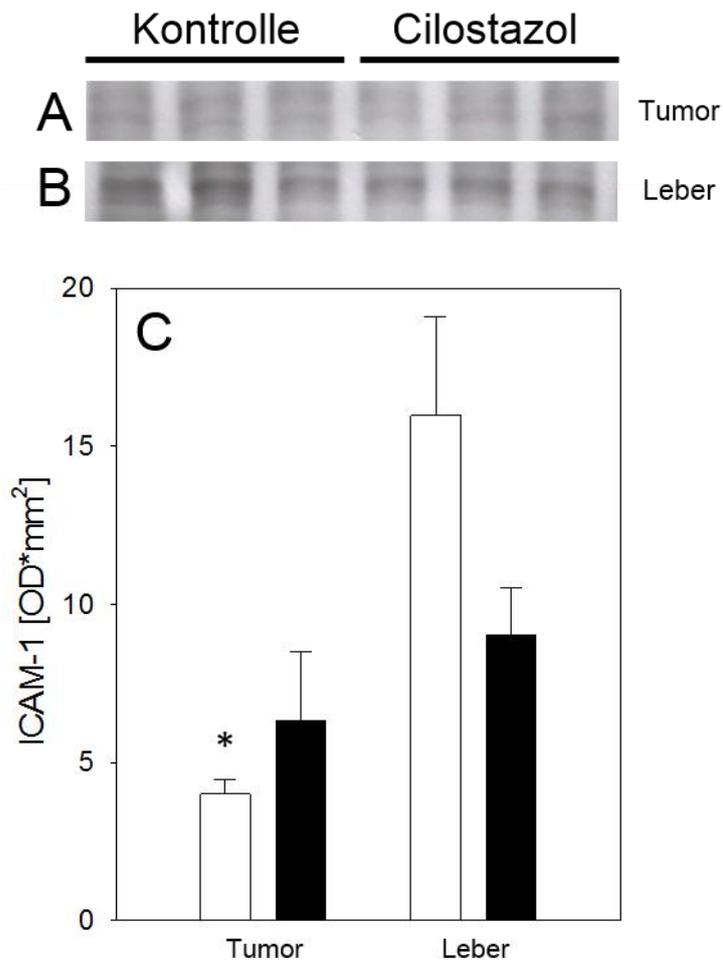


Abbildung 29: Bestimmung der ICAM-1-Expression mittels Western Blot (A, B) und densitometrischer Analyse (C) an Tag 14 nach Tumorimplantation in Tumorgewebe (A, C) und normalem Lebergewebe (B, C) von Tieren mit Leberteileresektion. Es erfolgte jeweils eine Vehikel- (Kontrolle: A, B; C; □; CON) oder eine Cilostazol-Behandlung (Cilostazol: A, B; C; ■; CLZ). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ versus Leber.

In Vehikel-behandelten Tieren fand sich eine signifikant geringere ICAM-1-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum normalen Lebergewebe (siehe Abb. 29C). Die ICAM-1-Expression war im Tumorgewebe von Cilostazol-behandelten Tieren minimal

erhöht im Vergleich zu der ICAM-1-Expression im normalen Lebergewebe von Cilostazol-behandelten Tieren. Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von 0,362 jedoch nicht signifikant (siehe Abb. 29C). Weder im Tumorgewebe noch im normalen Lebergewebe kam es zu einer signifikant unterschiedlichen ICAM-1-Expression zwischen den Vehikel-behandelten Tieren und den Cilostazol-behandelten Tieren (siehe Abb. 29C).

7 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde nach ausgedehnter Leberteilresektion in einem in vivo Rattenmodell die Wirkung von Cilostazol, einem Phosphodiesterase-3-Inhibitor, auf hepatische Metastasen eines kolorektalen Karzinoms untersucht. Dazu wurden das Tumorwachstum, die Tumolvaskularisierung, Tumorzellproliferation und -apoptose, die Tumornekrose-Areale sowie die Leukozyteninfiltration im normalen Lebergewebe untersucht.

Um die Auswirkung eines bestimmten Medikaments auf die Tumorzellproliferation und das Tumorwachstum zu untersuchen, braucht man ein geeignetes Tumormodell. Dabei stehen in vitro Modelle, wie z.B. die Verwendung von humanen Tumorzelllinien, in vivo Modelle, bei denen chemisch oder viral Tumore induziert werden, oder genetisch veränderte Mäuse, die zur Entstehung von Tumoren neigen, zur Verfügung (Dong et al., 2014; Frese und Tuveson, 2007; Kendall et al., 2006). Der Vorteil von in vivo Studien ist, dass man pathophysiologische Zusammenhänge, das komplexe Zusammenspiel einzelner Organsysteme und deren lokale und systemische Rückkopplungsmechanismen ganzheitlich analysieren kann (Frese und Tuveson, 2007; Menger und Lehr, 1993). Dagegen verringern in vitro Modelle die Anzahl benötigter Tierversuche und dienen der Aufklärung einzelner zellulärer Mechanismen oder Zell-Zell-Interaktionen. Es werden dabei isolierte Zellen, Zellverbände, Gewebe oder einzelne Organe betrachtet (Fukuoka et al., 2013; Hashimoto et al., 1994; Mollenhauer et al., 2012; Van de Bovenkamp et al., 2007). Da bei der vorliegenden Arbeit die kombinierten Einflüsse von Cilostazol und einer Leberteilresektion untersucht werden sollten, wurde ein in vivo Modell gewählt.

7.1 Diskussion von Material und Methoden

7.1.1 Das Modell der Tumorimplantation

Es gibt verschiedene Modelle Lebermetastasen zu induzieren und zu untersuchen. Darunter finden sich Lebermetastasenmodelle, bei denen es nach 6 bis 8 Wochen zu einer spontanen Metastasierung eines primären Kolontumors kommt. Hierbei werden die Tumorzellen in die Kolonwand injiziert. Des Weiteren können die Tumorzellen in die Milz injiziert werden, um so einen künstlichen Primärtumor zu induzieren, der über den

Milzvenenabfluss in die Leber metastasiert. Auch die Injektion der Tumorzellen in die Vena Porta führt zu einem Einschwemmen der Zellen in das Leberparenchym. Diese Modelle eignen sich ideal, um hämatogene Tumorzellverschleppung und deren Einwanderung in andere Organe zu untersuchen (Chambers et al., 2000; Garvie und Grant, 1971; Kollmar et al., 2004; Martins et al., 2008; Zhong et al., 2010). Die portalvenöse Injektion der Tumorzellen führt jedoch zu einer unphysiologisch hohen Tumorlast. Diese verursacht eine unkontrollierte Aussaat bzw. Metastasierung der Tumorzellen in das Lebergewebe (Kollmar et al., 2004). Bei der Analyse des Tumorwachstums mittels Ultraschall und der damit verbundenen Tumorangiogenese bedarf es jedoch eines lokalisierten und reproduzierbaren Tumolvolumens. Diese Bedingungen werden von dem Tumorimplantationsmodell, welches in dieser Arbeit verwendet und hinreichend von Kollmar et al. beschrieben wurde, erfüllt (Kollmar et al., 2004; Sperling et al., 2012). Dabei werden die Tumorzellen subkapsulär in den Leberlappen injiziert. Dadurch entwickelt sich lokalisiert eine singuläre Tumormetastase, deren Größe mit Hilfe des Ultraschalls untersucht werden kann. Die in der vorliegenden Studie benutzten WAG-Ratten wurden aufgrund ihres syngeneten Hintergrunds gegenüber den CC531-Tumorzellen verwendet.

7.1.2 Das Modell der Leberteileresektion

Bei einem mittleren Gewicht von 220-260g bieten WAG-Ratten neben ihrem genetischen Hintergrund gute Bedingungen für die mikrochirurgische Präparation der Leberlappen und die anschließende Resektion. Für die chirurgische Präparation wurden mikrochirurgische Instrumente zu Hilfe genommen, um die Leberteileresektion möglichst gewebeschonend durchzuführen.

Das Modell der Leberteileresektion bei der Ratte wurde schon 1931 von Higgins und Anderson beschrieben (Higgins und Anderson, 1931). Es ist allgemein akzeptiert und sicher durchführbar. Entsprechend der Erstbeschreibung werden dabei der ML und der LLL reseziert. In der vorliegenden Arbeit führten wir eine Modifikation mit Resektion der Leberlappen ML, SRL, IRL und CP durch (Martins et al., 2008). So war es möglich die Tumorzellen in die Unterseite des LLL zu implantieren und anschließend eine Ultraschalluntersuchung des Tumors durchzuführen. Zusätzlich dienten die tumorfreien Leberlappen AC und PC als Kontrolllappen der Tumorimplantation. Dadurch konnte der Einfluss von Cilostazol auf das normale Lebergewebe untersucht werden. Der Eingriff ist

schnell durchführbar und eignet sich hervorragend, um die Leberregeneration zu untersuchen (Higgins und Anderson, 1931; Mitchell und Willenbring, 2008). Die einsetzende Leberregeneration stimuliert dabei gleichzeitig auch das Wachstum von Mikrometastasen, die sich im verbliebenen Lebergewebe befinden (Koh et al., 2010; Martins et al., 2008; Paschos und Bird, 2010). In Ratten und Mäusen dauert die Phase der Leberregeneration 7-10 Tage und endet normalerweise mit der Wiederherstellung des ursprünglichen Lebervolumens (Fausto und Riehle, 2005; Fausto et al., 2006; Taub, 2004; Wemyss-Holden et al., 2002).

7.1.3 Untersuchungstechniken

Die **Laser Doppler Flowmetrie** (LDF) ist eine Möglichkeit der nicht invasiven Blutflussmessung. Bei der hier verwendeten Methode lassen sich wiederholbare Messungen des Blutflusses von Gefäßen und der Mikrozirkulation des Lebergewebes durchführen ohne dabei Leberparenchym zu traumatisieren. Die Eindringtiefe des dabei verwendeten Laserlichts ist auf etwa 2mm beschränkt (Fredriksson et al., 2009; Gush et al., 1984; Oberg, 1990). Das heißt, dass mittels LDF nur die oberflächliche Perfusion der Gefäße gemessen werden kann. Zusätzlich kann es trotz der einfachen Bedienung zu Artefakten bei der Messung des Blutflusses kommen. Bewegungen des Gewebes durch z.B. die Atmung oder chirurgische Manipulation und Änderungen des arteriolen Gefäßwiderstands durch z.B. einen erhöhten vaskulären Wandtonus können zu einem falschen LDF-Signal führen (Ahn et al., 1986; Colantuoni et al., 1994). Dabei ist zu beachten, dass mit der LDF keine Flussbestimmung in ml/g Gewebe durchgeführt werden kann, sondern die Durchblutung lediglich in arbiträren Perfusionseinheiten bestimmt wird. Diese errechnen sich aus der Geschwindigkeit der gemessenen Teilchen (hier Erythrozyten) und der intravasalen Konzentration der Erythrozyten. Demzufolge kann es bei einer Änderung des Hämatokrits oder bei Ödemen zu einer Änderung des mittels LDF ermittelten Wertes kommen, ohne dass die Perfusion tatsächlich verändert ist (Lehmann, 2000; Wang et al., 1992).

Im Jahr 2005 wurde von Wirtzfeld et al. erstmals das Verfahren der Volumenmessung von Prostata Tumoren mittels des **hochauflösenden Ultraschallsystems** am Mausmodell beschrieben (Wirtzfeld et al., 2005). Seither findet diese Untersuchungsmethode eine breite Anwendung in Tiermodellen zur Analyse des Tumorwachstums in der Prostata, der Leber, der Haut, der Blase und der Brust (Galiè et

al., 2004; Rooks et al., 2001; Saar et al., 2012; Sperling et al., 2012; Turnbull et al., 1996). Dabei handelt es sich um eine verhältnismäßig kostengünstige Methode mit geringer Morbidität und Mortalität. Da bei jeder Ultraschalluntersuchung eine Narkose für das Versuchstier benötigt wird, sollte die Anzahl der repetitiven Untersuchungen limitiert werden. Insgesamt stellt der hochauflösende Ultraschall eine valide und zuverlässige Methode dar, das Tumolvolumen zu messen, vor allem ab einem Tumordurchmesser von ca. 2,0mm (Wang et al., 2011; Wirtzfeld et al., 2006). Dadurch kann das Tumorstadium im Verlauf longitudinal abgebildet und die Anzahl an benötigten Versuchstieren verringert werden (Wang et al., 2011).

Eine **immunhistochemische** PCNA-Färbung dient der Analyse der zellulären Proliferation. Für Untersuchungen der Zellproliferation gibt es nicht den alleinigen „Goldstandard“. Dennoch ist die in dieser Studie verwendete PCNA-Färbung eine akkurate Methode, um die Zellproliferation zu quantifizieren (Assy und Minuk, 1997; Kubben et al., 1994). Als eine zusätzliche Methode zur Bestimmung der Zellproliferation wurde in HE-gefärbten Schnitten von Tumorgewebe die Anzahl der Mitose-Figuren ausgezählt. Ebenso gibt es verschiedene Möglichkeiten die Apoptose der Zellen zu bestimmen. Zum einen kann die Zellapoptose rein morphologisch mittels Lichtmikroskopie bestimmt werden. Zum anderen gibt es verschiedene immunhistochemische Verfahren, bei denen zum Beispiel entweder DNA-Fragmente (TUNEL) oder spezielle Proteine (Caspasen) gefärbt werden. Dabei stellt die Caspase-3-Färbung ein anerkanntes Verfahren zur Bestimmung der Apoptose von Zellen dar (Stadelmann und Lassmann, 2000).

7.2 Diskussion der Ergebnisse

Vorherige Studien konnten zeigen, dass Phosphodiesterase-3-Inhibitoren in der Lage sind, die Leberregeneration zu stimulieren (Akcan et al., 2006; Dold et al., 2011). Die vorliegende Studie hatte zum Ziel zu untersuchen, ob Cilostazol, ein Phosphodiesterase-3-Inhibitor, das metastatische Tumorstadium in der verbliebenen Leber ebenfalls steigert. Es konnte gezeigt werden, dass Cilostazol das Tumorstadium von kolorektalen Metastasen nicht stimuliert, weder in der normalen Leber noch nach Leberteilektomie. Insbesondere erhöhte Cilostazol nicht die Proliferation der Tumorzellen im Tumorgewebe an Tag 14 nach Tumorentstehung. Interessanterweise war Cilostazol in der Lage die Vaskularisierung der singulären Tumormetastasen und die

Leukozytenextravasation im normalen Lebergewebe, also die Leukozytenanzahl zwischen den portalen Blutgefäßen, zu verringern.

Seit mehr als einem Jahrzehnt ist bekannt, dass die nach einer partiellen Hepatektomie oder einer Embolisierung der Pfortader einsetzende Leberregeneration das Tumorwachstum verbliebener Lebermetastasen anregt (Bird et al., 2006; de Jong et al., 1996; Elias et al., 1999; Harun et al., 2007; Michalopoulos, 2007). Auch in der vorliegenden Studie konnte eine solche Tumorstimulation aufgrund einer Leberteileresektion beobachtet werden. Die Tumorumfänge der Tiere, die leberreseziert wurden, waren sowohl 7 Tage als auch 14 Tage nach Tumorimplantation durchschnittlich größer, als die der Tiere, die nicht leberreseziert wurden. Damit im Einklang zeigen die Daten der vorliegenden Studie einen nur geringfügigen Unterschied in den Proliferationsraten (Anteil PCNA-positiver Zellen und Anzahl der Mitose-Figuren an Tag 14) der Tumorzellen bedingt durch die Leberresektion an Tag 14. Die Leberteileresektion führte aber bei den Cilostazol-behandelten Tieren zu einer gesteigerten Apoptose (Anteil cleaved Caspase-3-positiver Zellen an Tag 14) der Tumorzellen. Allerdings wirkte sich diese gesteigerte Apoptose nicht signifikant auf das Tumorumfang der kolorektalen Lebermetastasen aus.

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass Cilostazol als pleiotrope Substanz verschiedenste Effekte im Organismus bewirkt. Seit etlichen Jahren ist bekannt, dass Cilostazol gefäßerweiternd auf das Endothel wirkt (Nakamura et al., 2001). Dementsprechend erhöht der Phosphodiesterase-3-Inhibitor den Blutfluss zu den Extremitäten und wird deshalb im klinischen Alltag bei der Therapie der Claudicatio intermittens eingesetzt (Tsung-Ming et al., 2001; Weintraub, 2006). Diese bekannte Verbesserung der Mikroperfusion durch Cilostazol konnten wir ebenfalls im normalen Lebergewebe feststellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Cilostazol a) die Aktivierung von Thrombozyten, die Aggregation von Thrombozyten und die Entstehung einer Thrombose reduziert, b) die Triglyzeride senkt und das high density lipoprotein (HDL) Cholesterin erhöht, und c) das Wachstum von vascular smooth muscle cells (VSMCs) inhibiert und so die Restenoseraten nach koronarer Stentimplantation senkt (Friedland et al., 2012; Geng et al., 2012; Weintraub, 2006).

Obwohl Cilostazol die Proliferation von VSMCs und von Epithelzellen der Niere hemmt, konnte gezeigt werden, dass Cilostazol die hepatozelluläre Proliferation während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie steigert (Akcan et al., 2006; Dold et

al., 2011; Kim et al., 2011; Muñoz et al., 2009). Dennoch ist bis heute wenig bekannt, ob Cilostazol zusätzlich Einflüsse auf das Tumorstadium hat. Murata et al. konnten in vitro demonstrieren, dass Cilostazol die Migration und damit die Motilität von humanen Tumorzellen des Kolons inhibiert (Murata et al., 1999). Ausgehend von diesen Daten sind die Autoren der Meinung, dass Cilostazol gegebenenfalls für die Therapie metastatischer Läsionen geeignet sein könnte. Des Weiteren ist Cilostazol in der Lage, sowohl in vivo als auch in vitro die Proliferation und Aktivierung von Hepatic stellate cells (HSCs) durch eine verringerte Expression von PDGFR zu hemmen (Saito et al., 2013). Wahrscheinlich ist die erniedrigte PDGF-vermittelte Proliferation der HSCs durch einen erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel aufgrund der Cilostazol-Behandlung bedingt (Graves et al., 1993; Mallat et al., 1998). HSCs, die ca. 10% der in der Ratten-Leber vorhandenen Zellen ausmachen, spielen eine entscheidende Rolle beim Wachstum von Tumormetastasen. Normalerweise sind HSCs für die Aufnahme und Speicherung von Vitamin A verantwortlich. Durch Tumorzellen angeregt transdifferenzieren die HSCs jedoch zu Myofibroblasten und fördern so die Migration und das Wachstum von Mikrometastasen. Zusätzlich versorgen die HSCs den Tumor mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Vor allem durch HSCs ausgeschütteter hepatocyte growth factor (HGF) und transforming growth factor beta (TGF- β) wirken stimulierend auf die Tumorzellen. Auch die Tumorangiogenese wird durch aktivierte HSCs über VEGF- und Angiopoetin 1-/2- Sekretion gesteigert (Kang et al., 2011). Durch eine Hemmung der Aktivierung von HSCs könnte Cilostazol auf diese Weise möglicherweise dem pro-metastatischen Microenvironment entgegenwirken. Tatsächlich gibt es Überlegungen andere PDGF-Rezeptor-Inhibitoren genau aus diesem Grund bei Patienten mit Lebermetastasen einzusetzen (Kang et al., 2011). Interessanterweise konnten Ikeda et al. zeigen, dass in leberteilresezierten Ratten, bei denen zuvor mehrere transitionale hepatische Karzinome mittels Tumorzellinjektion in die Pfortader induziert wurden, die Behandlung mit Cilostazol zu einem signifikant längerem Überleben führt (Ikeda et al., 1998). Eine weitere Studie belegt, dass Cilostazol die Proliferation von Synovialzellen, die aus dem Gelenkspalt an Rheuma erkrankter Patienten stammen, durch G2/M Zellzyklusarrest hemmt und zudem die Apoptose dieser Zellen vermutlich durch cAMP-abhängige Proteinkinaseaktivierung steigert (Park et al., 2010). Trotz der Tatsache, dass Cilostazol die hepatozelluläre Proliferation nach Leberteilresektion steigert, zeigt die vorliegende Studie, dass die Inhibition der Phosphodiesterase-3 durch Cilostazol die proliferative Aktivität von kolorektalen Tumormetastasen in der Leber nicht beeinflusst (Akcan et al., 2006; Dold et al., 2011).

Wahrscheinlich wirkt Cilostazol spezifisch auf Endothelzellen und die Vaskularisierung. Mendes et al. berichteten, dass Cilostazol die Expression von VEGF in einem Modell, bei dem Mäusen Polyether-Polyurethan-Schwämmchen implantiert wurden, verringerte (Mendes et al., 2009). Im Einklang mit diesen Daten zeigten Wang et al. ebenfalls eine Verringerung der VEGF-Expression durch Cilostazol in der Streptocozin-induzierten diabetischen Entzündung (Wang et al., 2008). Dagegen konnten einige aktuelle Studien an Versuchstieren, bei denen eine Ischämie der Gliedmaßen bzw. vorübergehend des Frontalhirns induziert wurde, zeigen, dass die VEGF-Expression durch die Behandlung mit Cilostazol verstärkt wird (Biscetti et al., 2012; Chao et al., 2012; Shin et al., 2010). Die letztgenannten Ergebnisse unterstützen die Erkenntnisse der vorliegenden Studie, die eine erhöhte VEGF-Expression im gesunden Lebergewebe von Cilostazol-behandelten Tieren nach Leberteilresektion zeigt.

Generell ist eine erhöhte Expression von VEGF mit einer gesteigerten Vaskularisierung assoziiert. Entsprechend gibt es mehrere Publikationen, die zeigen, dass eine Cilostazol-induzierte Erhöhung der VEGF-Expression mit einer vermehrten Vaskularisierung einhergeht (Biscetti et al., 2012; Chao et al., 2012; Shin et al., 2010). Überraschenderweise deuten die Daten der vorliegenden Studie daraufhin, dass es nach Cilostazolbehandlung trotz einer Steigerung der VEGF-Expression zu einer Verringerung der Tumorgefäßdichte (Dichte an PECAM-1-positiven Zellen) kommt. Tatsächlich konnten andere Arbeitsgruppen ebenfalls zeigen, dass die VEGF-Expression nicht zwangsläufig mit dem Ausmaß der Vaskularisierung eines Tumors korreliert (Rajesh et al., 2004; Wechsel et al., 2000). Die Tatsache, dass eine erhöhte VEGF-Expression mit einer verringerten Vaskularisierung einhergeht, hat vermutlich andere Ursachen. Möglicherweise steigert Cilostazol die intrazelluläre VEGF-Produktion, inhibiert aber gleichzeitig dessen Freisetzung, wie es für Pentoxifyllin, einem nicht selektiven Phosphodiesterase-Inhibitor, beschrieben ist (Amirkhosravi et al., 1998). Dadurch würde Cilostazol die VEGF-induzierten Effekte auf die Vaskularisierung hemmen. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass Cilostazol die Sensitivität der Endothelzellen gegenüber VEGF herabsetzt. Netherton et al. konnten belegen, dass Cilostamide, ebenfalls ein selektiver Phosphodiesterase-3-Inhibitor, in der Lage ist, die VEGF-induzierte Migration von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene und von humanen Endothelzellen der Aorta fast komplett zu unterdrücken (Netherton und Maurice, 2005). Da der Einwanderung von Endothelzellen eine bedeutende Rolle bei der Vaskularisierung zukommt, ist anzunehmen, dass Cilostazol die Tumervaskularisierung trotz erhöhter VEGF-Expression

wohl durch die Hemmung der VEGF-induzierten Migration von Endothelzellen verringert. Diese Ansicht wird weiterhin bestärkt durch die Tatsache, dass Cilostazol die cAMP-Spiegel anhebt und eine Erhöhung von cAMP die VEGF- und basic fibroblast growth factor (bFGF)-induzierte Proliferation inhibiert (D'Angelo et al., 1997).

In der vorliegenden Studie konnte dennoch keine Verkleinerung der Tumore von Cilostazol-behandelten Tieren durch eine geringere Tumorgefäßdichte beobachtet werden. Cilostazol war 14 Tage nach Tumorimplantation nicht in der Lage, die Apoptoseraten der Tumorzellen zu erhöhen, weder in der normalen Leber noch nach Leberteilektomie. Dies könnte darauf beruhen, dass Cilostazol aufgrund der vasodilatatorischen Effekte die jeweilige Perfusion der Blutgefäße erhöht (Weintraub, 2006). Zusätzlich ist es möglich, dass der Tumor nach einer Behandlung mit Cilostazol weniger Blutversorgung für sein Wachstum benötigt, da Cilostazol die Toleranz gegenüber Ischämie durch die Hochregulierung der phosphorylierten Casein Kinase 2 (CK2) erhöht (Lee et al., 2004; Santos et al., 2012). Dies könnte dem Zelltod durch Hypoxie entgegenwirken. Weiterhin ist Cilostazol in der Lage, die Ausschüttung von ATP unter hypoxischen Bedingungen zu verstärken (Sprague et al., 2011). Im Einklang mit diesen Daten verhinderte Cilostazol in der vorliegenden Studie nahezu vollständig die Entstehung von nekrotischen Arealen innerhalb des Tumorgewebes von sham-operierten Tieren. Dies könnte den Tumormetastasen ermöglichen, unter Hypoxie trotz einer erniedrigten Gefäßdichte zu überleben. Zusätzlich ist Cilostazol wohl in der Lage, das Ausmaß der Tumorphypoxie in wachsenden Tumoren sogar zu vermindern. Dies wäre von großem Interesse, da Hypoxie innerhalb von Tumoren einen entscheidenden Faktor für eine vermehrte Metastasierung von Primärtumoren und ein erhöhtes Tumorstadium darstellt (De Bock et al., 2011). Eine bedeutende Rolle kommt dabei den hypoxia-inducible factors (HIFs) zu, welche vor allem in Tumormetastasen, aber auch in vielen soliden Tumoren verstärkt exprimiert sind und das Tumorstadium durch ihre Veränderung im Metabolismus der Tumorzellen stimulieren (De Bock et al., 2011; Semenza, 2010).

Partielle Hepatektomie führt im verbliebenen Lebergewebe zu einem Anstieg der Leukozytenakkumulation (Boermeester et al., 1995). Die in der vorliegenden Studie durch Cilostazol signifikant verringerte periportale Leukozytenextravasation im normalen Lebergewebe könnte erklären, warum die Tumore sich unter Cilostazol nicht verkleinert haben und warum sich eine verminderte Tumorstadiumgenese zeigte. Seit mehreren Jahren

ist bekannt, dass es in soliden Tumoren unterschiedlicher Herkunft, insbesondere bei Tumoren des Kolons, zu einer dichten Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Tumor-assoziierten Makrophagen kommt und so das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese beeinflusst wird (Murdoch et al., 2008; Nielsen et al., 1996; Pollard, 2004). Sowohl in vivo als auch in vitro konnte gezeigt werden, dass aktivierte neutrophile Granulozyten pro-angiogene Signalproteine, v.a. Matrix-Metalloprotease-9 und VEGF, ausschütten und so die Tumorangiogenese stimulieren (Galdiero et al., 2013; Jablonska et al., 2010; Mantovani, 2009; Nozawa et al., 2006;). Zudem führt in Mäusen eine Eliminierung der Granulozyten mit Hilfe eines spezifischen anti-granulozytären Antikörpers (anti-Gr1) zu einer deutlichen Verringerung des Tumorwachstums und der Tumorangiogenese (Kuang et al., 2011; Pekarek et al., 1995). Eine Verringerung der Leukozytenextravasation durch Cilostazol würde so der Entwicklung von neuen Gefäßen in den kolorektalen Lebermetastasen entgegenwirken. Zusätzlich führte eine Behandlung mit Cilostazol bei Ratten nach Retinaischämie über eine geringere Leukozytenakkumulation und Leukozyten-Endothel-Interaktion zu neuroprotektiven Effekten. Diese Abschwächung der inflammatorischen Antwort auf die Ischämie ergab sich aus einer Minderexpression von ICAM-1 mRNA durch Cilostazol (Iwama et al., 2007). Es wird vermutet, dass die anti-inflammatorische Wirkung von Phosphodiesterase-3-Inhibitoren durch die erniedrigte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , IL-1 und IL-6, bedingt ist (Yamaguchi et al., 2010). In der vorliegenden Studie lässt die Expression von ICAM-1 im normalen Lebergewebe einen Trend zu einer Verringerung durch Cilostazol erkennen. Dagegen ist die Expression von ICAM-1 im Tumor nach einer Behandlung mit Cilostazol leicht, wenn auch nicht signifikant, erhöht. Dass das Signifikanzniveau in beiden Fällen nicht erreicht wurde, mag an der geringen Fallzahl (n=3) der gemessenen ICAM-1 Expressionen mittels Western Blot liegen. Tachimori et al. konnten bei Mäusen zeigen, dass eine gesteigerte Expression durch Virustransfektion von ICAM-1 in kolorektale Tumorzellen (LM-H3) mit einem verringerten Tumorwachstum einhergeht (Tachimori et al., 2005). Zudem ist die Inzidenz von Lebermetastasen bei Patienten, die ein ICAM-1-positives kolorektales Karzinom haben, deutlich niedriger, als bei Patienten, deren Tumore keine ICAM-1 Expression aufweisen. Damit verbunden ist ein signifikant verringertes krankheitsfreies 5-Jahresüberleben der Patienten, die an einem ICAM-1-negativem Tumor leiden (Maeda et al., 2002). Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich eine verringerte Fähigkeit der zytotoxischen T-Zellen und der Natürlichen Killerzellen, ICAM-1 vermittelt die Tumorzellen durch Zellyse anzugreifen (Maeda et al.,

2002; Tachimori et al., 2005).

7.3 Schlussfolgerung

Die Erkenntnisse, gewonnen durch Versuche an Tieren, sind nur schwer auf den Menschen übertragbar (Seok et al., 2013). Dennoch gibt es eine lange Historie und zahlreiche Vorteile, wie z.B. Anwendbarkeit, Kosteneffizienz und transgene KO-Zuchtstämme, die dafür sprechen, die Wirkungsweise von Medikamenten auf z.B. die Tumorbilogie mit Hilfe von Kleinterversuchen zu untersuchen (Herter-Sprie et al., 2013; Kislinger und Gramolini, 2010; Müller und Grossniklaus, 2010; Rosenberg et al., 2009). Das in der vorliegenden Studie verwendete Medikament Cilostazol ist ein Phosphodiesterase-3-Inhibitor, der schon seit langem für den klinischen Gebrauch zur Behandlung von Patienten mit Claudicatio intermittens zugelassen ist. Vorherige Studien an Ratten zeigten, dass Cilostazol in der Lage ist, die Leberregeneration nach erweiterter Hepatektomie zu steigern. Deshalb galt es zu überprüfen, ob Cilostazol dadurch auch stimulierend auf das Wachstum und die Proliferation von kolorektalen Tumorzellen in der Leber wirkt, um so den wahren klinischen Nutzen von Cilostazol zu bestimmen.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Cilostazol keinen stimulierenden Einfluss auf das Tumorstadium und die Proliferation von Tumorzellen einer singulären kolorektalen Lebermetastase hat. Zudem machte es keinen Unterschied, ob die Tiere einer Leberteilresektion zugeführt wurden oder nicht. Gleichwohl führte die Behandlung mit Cilostazol erstaunlicherweise zu einer signifikanten Verringerung der Tumorstadium vor allem in der Tumorstadium. Dies war nicht durch die Inhibition von VEGF vermittelt. Zusätzlich war Cilostazol in der Lage, die Leukozytenextravasation im normalen Lebergewebe signifikant vermutlich über eine verminderte Expression von ICAM-1 zu verringern. Da Cilostazol keinen Einfluss auf das Tumorstadium von Lebermetastasen eines Kolonkarzinoms hatte, stellt der Phosphodiesterase-3-Inhibitor ein Medikament von potentiell großem klinischem Nutzen zur medikamentösen Steigerung der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie dar.

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| AC | Lobus caudatus anterior der Rattenleber |
| ANOVA | one-way analysis of variance |
| ATP | Adenosintri-phosphat |
| aU | arbitrary units |
| AWMF | Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| b.w. | body weight |
| bzw. | beziehungsweise |
| CAE | AS-D Chloracetatesterase |
| cAMP | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| °C | Grad Celsius |
| CC531 | rattenspezifische Kolonkarzinom Zelllinie |
| CK2 | Casein Kinase 2 |
| CLZ | Cilostazol-Behandlung |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CON | Vehikel- bzw. Kontroll-Behandlung |
| d | Tag |
| DNA (DNS) | Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| d.h. | das heißt |
| ECL | enhanced chemiluminescence |
| EDTA | ethylene diamine tetraacetic acid |
| EGF | epidermal growth factor |

| | |
|---------|--|
| EPO | Erythropoietin |
| FAP | Familiäre Adenomatosis Polyposis Coli |
| FCS | foetal calf serum |
| FDA | US Food and Drug Administration |
| G | Gauge |
| g | Gramm oder Erdbeschleunigung |
| HB-EGF | heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor |
| HDL | high density lipoproteins |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HGF | hepatocyte growth factor |
| HIF | hypoxia-inducible factor |
| HNPCC | Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom |
| HPF | High Power Field |
| HSC | hepatic stellate cells |
| ICAM-1 | intercellular adhesion molecule-1 |
| i.d.R. | in der Regel |
| IGF | insulin-like growth factor |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL-1/-6 | Interleukin-1/-6 |
| IRL | inferiorer rechter Lappen der Rattenleber |
| IU | international units |
| IVC | Vena cava inferior |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| kHz | Kilohertz |
| Ki-67 | Kiel-67 |

| | |
|------------------|--|
| KO | Knock-out |
| KRK | kolorektales Karzinom |
| LDF | Laser Doppler Fluxmetrie |
| LITT | Laserinduzierte Thermotheapie |
| LLL | linker lateraler Lappen der Rattenleber |
| LM | linker medianer Lappen der Rattenleber |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ML | mittlerer Lappen der Rattenleber |
| ml | Milliliter |
| µl | Mikroliter |
| mm | Millimeter |
| µm | Mikrometer |
| mM | Millimol |
| MW | Mittelwert |
| mRNA | messenger ribonucleic acid |
| n | Anzahl |
| NaCl | Natrium-Chlorid |
| NaN ₃ | Natriumazid |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| p | Signifikanzniveau |
| pAVK | periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| PBS | phosphate buffered solution |
| PC | Lobus caudatus posterior der Rattenleber |
| PCNA | proliferating cell nuclear antigen |

| | |
|---------------|--|
| PECAM-1 | platelet endothelial cell adhesion molecule-1 |
| PDGFR | platelet-derived growth factor receptor |
| pH | Pondus hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration) |
| PHX | ausgedehnte Leberresektion = partielle Hepatektomie |
| p.o. | per os |
| POD | Peroxidase |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RAAS | Renin-Angiotensin-System |
| RM | rechter medianer Lappen der Rattenleber |
| RPMI | Zellkulturmedium des Roswell Park Memorial Institute |
| s | Sekunde |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | sodium dodecylsulfate |
| SEM | Standardfehler des Mittelwerts |
| SRL | superiorer rechter Lappen der Rattenleber |
| Tab. | Tabelle |
| TBS-T | tris buffered saline with Tween 20 |
| TGF- β | transforming growth factor-beta |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor-alpha |
| TUNEL | terminal uridine deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling |
| UKCCCR | United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |
| v.a. | vor allem |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |

| | |
|----------------|--------------------------------|
| vgl. | vergleiche |
| vs. | versus (gegenüber) |
| VSMC | vascular smooth muscle cell |
| WAG/Rij-Ratten | Wistar Albino Glaxo/Rij-Ratten |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| z.B. | zum Beispiel |

9 Literaturverzeichnis

1. Ahn H, Lindhagen J, Nilsson GE, Oberg PA, Lundgren O (1986) Assessment of blood flow in the small intestine with laser Doppler flowmetry. *Scand J Gastroenterol* 21:863–870
2. Akcan A, Kucuk C, Ok E, Canoz O, Muhtaroglu S, Yilmaz N, Yilmaz Z (2006) The effect of amrinone on liver regeneration in experimental hepatic resection model. *J Surg Res* 130:66–72
3. Aller MA, Arias N, Prieto I, Agudo S, Gilsanz C, Lorente L, Arias JL, Arias J (2012) A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. *World J Hepatol* 4:199–208
4. Almond NE, Wheatley AM (1992) Measurement of hepatic perfusion in rats by laser Doppler flowmetry. *Am J Physiol* 262:G203–G209
5. Amirkhosravi A, Meyer T, Warnes G, Amaya M, Malik Z, Biggerstaff JP, Siddiqui FA, Sherman P, Francis JL (1998) Pentoxifylline inhibits hypoxia-induced upregulation of tumor cell tissue factor and vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost* 80:598–602
6. Assy N, Minuk GY (1997) Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* 26:945–952
7. Bengtsson G, Carlsson G, Hafström L, Jönsson PE (1981) Natural history of patients with untreated liver metastases from colorectal cancer. *Am J Surg* 141:586–589
8. Bird NC, Mangnall D, Majeed AW (2006) Biology of colorectal liver metastases: A review. *J Surg Oncol* 94:68–80
9. Biscetti F, Pecorini G, Straface G, Arena V, Stigliano E, Rutella S, Locatelli F, Angelini F, Ghirlanda G, Flex A (2012) Cilostazol promotes angiogenesis after peripheral ischemia through a VEGF-dependent mechanism. *Int J Cardiol* 167:910–916
10. Boermeester MA, Straatsburg IH, Houdijk AP, Meyer C, Frederiks WM, Westdorp RI, van Noorden CJ, van Leeuwen PA (1995) Endotoxin and interleukin-1 related hepatic inflammatory response promotes liver failure after partial hepatectomy. *Hepatology* 22:1499–1506
11. Brenner H, Chang-Claude J, Jansen L, Knebel P, Stock C, Hoffmeister M (2014) Reduced risk of colorectal cancer up to 10 years after screening, surveillance, or diagnostic colonoscopy. *Gastroenterology* 146:709–717
12. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferrareso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P (1997) The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* 183:477–485

13. Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, Morris VL, Groom AC (2000) Clinical targets for anti-metastasis therapy. *Adv Cancer Res* 79:91–121
14. Chao TH, Tseng SY, Li YH, Liu PY, Cho CL, Shi GY, Wu HL, Chen JH (2012) A novel vasculo-angiogenic effect of cilostazol mediated by cross-talk between multiple signalling pathways including the ERK/p38 MAPK signalling transduction cascade. *Clin Sci* 123:147–159
15. Cho IJ, Sung DK, Kang KW, Kim SG (2009) Oltipraz promotion of liver regeneration after partial hepatectomy: The role of PI3-kinase-dependent C/EBPbeta and cyclin E regulation. *Arch Pharm Res* 32:625–635
16. Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, Sumetchotimetha W, Rangsri R, Schulick RD, Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL (2002) Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* 235:759–766
17. Christophi C, Harun N, Fifis T (2008) Liver regeneration and tumor stimulation—a review of cytokine and angiogenic factors. *J Gastrointest Surg* 12:966–980
18. Clavien P-A, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R (2007) Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* 356:1545–1559
19. Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M (1994) Microvascular vasomotion: origin of laser Doppler flux motion. *Int J Microcirc Clin Exp* 14:151–158
20. Collins P, Brittenden J (2004) Treatment of intermittent claudication: cilostazol. *Hosp Med* 65:466–470
21. D'Angelo G, Lee H, Weiner RI (1997) cAMP-dependent protein kinase inhibits the mitogenic action of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor in capillary endothelial cells by blocking Raf activation. *J Cell Biochem* 67:353–366
22. De Bock K, Mazzone M, Carmeliet P (2011) Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nat Rev Clin Oncol* 8:393–404
23. De Jong KP, Slooff MJ, de Vries EG, Brouwers MA, Terpstra OT (1996) Effect of partial liver resection on tumour growth. *J Hepatol* 25:109–121
24. Dold S, von Heesen M, Müller S, Kollmar O, Schilling MK, Menger MD, Moussavian MR (2011) Effect of Cilostazol® on hepatic microcirculation and liver regeneration after partial hepatectomy in a rat model. *Langenbecks Arch Surg* 396:581 (abstract)
25. Dong L, Wang F, Yin X, Chen L, Li G, Lin F, Ni W, Wu J, Jin R, Jiang L (2014) Overexpression of S100P promotes colorectal cancer metastasis and decreases chemosensitivity to 5-FU in vitro. *Mol Cell Biochem* 389:257–264
26. Douillard J-Y, Sobrero A, Carnaghi C, Comella P, Díaz-Rubio E, Santoro A, Van Cutsem E (2003) Metastatic colorectal cancer: integrating irinotecan into combination and sequential chemotherapy. *Ann Oncol* 14 Suppl 2:ii7–ii12

27. Elias D, De Baere T, Roche A, Mducreux Leclere J, Lasser P (1999) During liver regeneration following right portal embolization the growth rate of liver metastases is more rapid than that of the liver parenchyma. *Br J Surg* 86:784–788
28. Fahy BN, Fisher BC (2012) Synchronous resection of colorectal primary and hepatic metastasis. *J Gastrointest Oncol* 3:48–58
29. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ (2006) Liver regeneration. *Hepatology* 43:S45–S53
30. Fausto N, Riehle KJ (2005) Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12:181–189
31. Fisher B, Fisher ER (1959) Experimental evidence in support of the dormant tumor cell. *Science* 130:918–919
32. Flieger D, Keller R, Fischbach W (2004) Palliative treatment for colorectal cancer. *Internist (Berl)* 45:786–794
33. Fredriksson I, Larsson M, Strömberg T (2009) Measurement depth and volume in laser Doppler flowmetry. *Microvasc Res* 78:4–13
34. Frese KK, Tuveson DA (2007) Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7:645–658
35. Friedland SN, Eisenberg MJ, Shimony A (2012) Meta-analysis of randomized controlled trials on effect of cilostazol on restenosis rates and outcomes after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 109:1397–1404
36. Fukuoka T, Hayashi T, Hirayama M, Maruyama H, Tanahashi N (2014) Cilostazol inhibits platelet-endothelial cell interaction in murine microvessels after transient bilateral common carotid artery occlusion. *J Stroke Cerebrovasc* 23:1056–1061
37. Galdiero MR, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S (2013) Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* 218:1402–1410
38. Galiè M, D’Onofrio M, Calderan L, Nicolato E, Amici A, Crescimanno C, Marzola P, Sbarbati A (2004) In vivo mapping of spontaneous mammary tumors in transgenic mice using MRI and ultrasonography. *J Magn Reson Imaging* 19:570–579
39. Garvie WH, Grant RM (1971) Liver metastases-an experimental study. *Br J Cancer* 25:166–171
40. Geng D, Deng J, Jin D, Wu W, Wang J (2012) Effect of cilostazol on the progression of carotid intima-media thickness: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 220:177–183
41. Goger S (2011) Bedeutung der Hämoxxygenase-1 für die intestinale Perfusion und Integrität bei Gallengangsligatur und nach ausgedehnter Leberresektion.

Dissertationsschrift, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

42. Gomez D, Malik HZ, Bonney GK, Wong V, Toogood GJ, Lodge JPA, Prasad KR (2007) Steatosis predicts postoperative morbidity following hepatic resection for colorectal metastasis. *Br J Surg* 94:1395–1402
43. Görög D, Tóth A, Weltner J (1997) Prognosis of untreated liver metastasis from rectal cancer. *Acta Chir Hung* 36:106–107
44. Graves LM, Bornfeldt KE, Raines EW, Potts BC, Macdonald SG, Ross R, Krebs EG (1993) Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10300–10304
45. Gush RJ, King TA, Jayson MI (1984) Aspects of laser light scattering from skin tissue with application to laser Doppler blood flow measurement. *Phys Med Biol* 29:1463–1476
46. Haberland J, Bertz J, Wolf U, Ziese T, Kurth BM (2010) German cancer statistics 2004. *BMC Cancer* 10:52
47. Harun N, Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C (2007) Liver regeneration stimulates tumor metastases. *J Surg Res* 138:284–290
48. Hashimoto Y, Itoh K, Nishida K, Okano T, Miyazawa Y, Okinaga K (1994) Rapid superoxide production by endothelial cells and their injury upon reperfusion. *J Surg Res* 57:693–697
49. von Heesen M, Schuld J, Sperling J, Grünhage F, Lammert F, Richter S, Schilling MK, Kollmar O (2011) Parenchyma-preserving hepatic resection for colorectal liver metastases. *Langenbecks Arch Surg* 397:383–395
50. Hemming AW, Reed AI, Howard RJ, Fujita S, Hochwald SN, Caridi JG, Hawkins IF, Vauthey JN (2003) Preoperative portal vein embolization for extended hepatectomy. *Ann Surg* 237:686–691
51. Herter-Sprie GS, Kung AL, Wong KK (2013) New cast for a new era: preclinical cancer drug development revisited. *J Clin Invest* 123:3639–3645
52. Hiatt WR (2005) The US experience with cilostazol in treating intermittent claudication. *Atheroscler Suppl.* 6:21–31
53. Higgins G, Anderson R (1931) Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12:186–202
54. Høyer M, Erichsen R, Gandrup P, Nørgaard M, Jacobsen JB (2011) Survival in patients with synchronous liver metastases in central and northern Denmark, 1998 to 2009. *Clin Epidemiol* 3, Suppl 1:11–17
55. Ikeda Y, Matsumata T, Takenaka K, Yamagata M, Sugimachi K (1998) Effects of doxorubicin and/or cilostazol on cancer cells during liver regeneration after two-

- thirds hepatectomy in rats. *Oncology* 55:354–356
56. Ismaili N (2011) Treatment of colorectal liver metastases. *World J Surg Oncol* 9:154
 57. Iwama D, Miyamoto K, Miyahara S, Tamura H, Tsujikawa A, Yamashiro K, Kiryu J, Yoshimura N (2007) Neuroprotective effect of cilostazol against retinal ischemic damage via inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 5:818–825
 58. Jablonska J, Leschner S, Westphal K, Lienenklaus S, Weiss S (2010) Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest* 120:1151–1164
 59. Kang N, Gores GJ, Shah VH (2011) Hepatic stellate cells: partners in crime for liver metastases? *Hepatology* 54:707–713
 60. Kayanoki Y, Che W, Kawata S, Matsuzawa Y, Higashiyama S, Taniguchi N (1997) The effect of cilostazol, a cyclic nucleotide phosphodiesterase III inhibitor, on heparin-binding EGF-like growth factor expression in macrophages and vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 238:478–481
 61. Kelly H, Goldberg RM (2005) Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J Clin Oncol* 23:4553–4560
 62. Kendall SD, Adam SJ, Counter CM (2006) Genetically engineered human cancer models utilizing mammalian transgene expression. *Cell Cycle* 5:1074–1079
 63. Kim JE, Sung JY, Woo C-H, Kang YJ, Lee KY, Kim HS, Kwun WH, Choi HC (2011) Cilostazol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and reactive oxygen species production through activation of amp-activated protein kinase induced by heme oxygenase-1. *Korean J Physiol Pharmacol* 15:203–210
 64. Kislinger T, Gramolini AO (2010) Proteome analysis of mouse model systems: A tool to model human disease and for the investigation of tissue-specific biology. *J Proteomics* 73:2205–2218
 65. Koh SL, Ager EI, Christophi C (2010) Liver regeneration and tumour stimulation: implications of the renin-angiotensin system. *Liver Int* 30:1414–1426
 66. Kollmar O, Schilling MK, Menger MD (2004) Experimental liver metastasis: standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin Exp Metastasis* 21:453–460
 67. Konopke R, Roth J, Volk A, Pistorius S, Folprecht G, Zoephel K, Schuetze C, Laniado M, Saeger HD, Kersting S (2012) Colorectal liver metastases: an update on palliative treatment options. *J Gastrointest Liver Dis* 21:83–91
 68. Konopke R, Saeger HD (2003) Liver metastases. Diagnosis and therapy. *Chirurg* 74:866–884
 69. Krause P, Flikweert H, Monin M, Seif Amir Hosseini A, Helms G, Cantanhede G,

- Ghadimi BM, Koenig S (2013) Increased growth of colorectal liver metastasis following partial hepatectomy. *Clin Exp Metastasis* 30:681–693
70. Kuang DM, Zhao Q, Wu Y, Peng C, Wang J, Xu Z, Yin XY, Zheng L (2011) Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 54:948–955
71. Kubben FJ, Peeters-Haesevoets A, Engels LG, Baeten CG, Schutte B, Arends JW, Stockbrügger RW, Blijham GH (1994) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut* 35:530–535
72. Laschke MW, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Gashaw I, Reinhardt M, Hauff P, Zollner TM, Menger MD (2010) High-resolution ultrasound imaging. *Am J Pathol* 176:585–593
73. Lee JH, Kim KY, Lee YK, Park SY, Kim CD, Lee WS, Rhim BY, Hong KW (2004) Cilostazol prevents focal cerebral ischemic injury by enhancing casein kinase 2 phosphorylation and suppression of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 phosphorylation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 308:896–903
74. Lehmann C (2000) Tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation bei Endotoxinämie. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin
75. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF (2013) Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom
76. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
77. Maeda K, Kang S-M, Sawada T, Nishiguchi Y, Yashiro M, Ogawa Y, Ohira M, Ishikawa T, Hirakawa-YS Chung K (2002) Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 9:511–514
78. Majek O, Gondos A, Jansen L, Emrich K, Hollecsek B, Katalinic A, Nennecke A, Eberle A, Brenner H (2012) Survival from colorectal cancer in Germany in the early 21st century. *Br J Cancer* 106:1875–1880
79. Mallat A, Gallois C, Tao J, Habib A, Maclouf J, Mavier P, Préaux AM, Lotersztajn S (1998) Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP pathway and cross-talk with endothelin receptors. *J Biol Chem* 273:27300–27305
80. Martins PNA, Theruvath TP, Neuhaus P (2008) Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* 28:3–11
81. Mendes JB, Campos PP, Rocha MA, Andrade SP (2009) Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation, and fibrosis in sponge-induced intraperitoneal adhesion in mice. *Life Sci* 84:537–543

82. Menger MD, Lehr HA (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14:519–522
83. Michalopoulos GK (2007) Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213:286–300
84. Mitchell C, Willenbring H (2008) A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc* 3:1167–1170
85. Mollenhauer M, Kiss J, Dudda J, Kirchberg J, Rahbari N, Radhakrishnan P, Niemietz T, Rausch V, Weitz J, Schneider M (2012) Deficiency of the oxygen sensor PHD1 augments liver regeneration after partial hepatectomy. *Langenbecks Arch Surg* 397:1313–1322
86. Mantovani A (2009) The yin-yang of tumor-associated neutrophils. *Cancer Cell* 16:173–174
87. Morris EJA, Forman D, Thomas JD, Quirke P, Taylor EF, Fairley L, Cottier B, Poston G (2010) Surgical management and outcomes of colorectal cancer liver metastases. *Br J Surg* 97:1110–1118
88. Mösllein G (2008) Hereditary colorectal cancer. *Chirurg* 79:1038–1046
89. Müller B, Grossniklaus U (2010) Model organisms-A historical perspective. *J Proteomics* 73:2054–2063
90. Muñoz B, Huerta M, López-Bayghen E (2009) Cilostazol reduces proliferation through c-Myc down-regulation in MDCK cells. *Eur J Pharmacol* 616:22–30
91. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE (2008) The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8:618–631
92. Murata K, Kameyama M, Fukui F, Ohigashi H, Hiratsuka M, Sasaki Y, Kabuto T, Mukai M, Mammoto T, Akedo H, Ishikawa O, Imaoka S (1999) Phosphodiesterase type III inhibitor, cilostazol, inhibits colon cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 17:525–530
93. Nakamura T, Houchi H, Minami A, Sakamoto S, Tsuchiya K, Niwa Y, Minakuchi K, Nakaya Y (2001) Endothelium-dependent relaxation by cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on rat thoracic aorta. *Life Sci* 69:1709–1715
94. Netherton SJ, Maurice DH (2005) Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: implications in angiogenesis. *Mol Pharmacol* 67:263–272
95. Newman AB, Sutton-Tyrrell K, Rutan GH, Locher J, Kuller LH (1991) Lower extremity arterial disease in elderly subjects with systolic hypertension. *J Clin Epidemiol* 44:15–20
96. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GC 2nd, Lyman S, Paddock C, Muller WA (1990) PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247:1219–1222

97. Nielsen BS, Timshel S, Kjeldsen L, Sehested M, Pyke C, Borregaard N, Danø K (1996) 92 kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer. *Int J Cancer* 65:57–62
98. Nishino M, Iimuro Y, Ueki T, Hirano T, Fujimoto J (2008) Hepatocyte growth factor improves survival after partial hepatectomy in cirrhotic rats suppressing apoptosis of hepatocytes. *Surgery* 144:374–384
99. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M, others (2008) Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet* 371:1007–1016
100. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D (2006) Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12493–12498
101. Oberg PA (1990) Laser-Doppler flowmetry. *Crit Rev Biomed Eng* 18:125–163
102. Park SY, Lee SW, Shin HK, Chung WT, Lee WS, Rhim BY, Hong KW, Kim CD (2010) Cilostazol enhances apoptosis of synovial cells from rheumatoid arthritis patients with inhibition of cytokine formation via Nrf2-linked heme oxygenase 1 induction. *Arthritis Rheum* 62:732–741
103. Paschos KA, Bird NC (2010) Liver regeneration and its impact on post-hepatectomy metastatic tumour recurrence. *Anticancer Res* 30:2161–2170
104. Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H (1995) Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med* 181:435–440
105. Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4:71–78
106. Poon RT, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, Yeung C, Wong J (2004) Improving perioperative outcome expands the role of hepatectomy in management of benign and malignant hepatobiliary diseases. *Transactions of the Meeting of the American Surgical Association CXXII* 296–308
107. Primrose JN (2010) Surgery for colorectal liver metastases. *Br J Cancer* 102:1313–1318
108. Rajesh L, Joshi K, Bhalla V, Dey P, Radotra BD, Nijhawan R (2004) Correlation between VEGF expression and angiogenesis in breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 26:105–108
109. Rees M, Tekkis PP, Welsh FKS, O'Rourke T, John TG (2008) Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients. *Ann Surg* 247:125–135
110. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in

- Deutschland e.V., 2012. Krebs in Deutschland 2007/2008, 8th ed. Berlin
111. Rooks V, Beecken WD, Iordanescu I, Taylor GA (2001) Sonographic evaluation of orthotopic bladder tumors in mice treated with TNP-470, an angiogenic inhibitor. *Acad Radiol* 8:121–127
 112. Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T (2009) Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 30:183–196
 113. Ruers T, Bleichrodt RP (2002) Treatment of liver metastases, an update on the possibilities and results. *Eur J Cancer* 38:1023–1033
 114. Saar M, Körbel C, Jung V, Suttman H, Grobholz R, Stöckle M, Unteregger G, Menger MD, Kamradt J (2012) Experimental orthotopic prostate tumor in nude mice: techniques for local cell inoculation and three-dimensional ultrasound monitoring. *Urol Oncol* 30:330–338
 115. Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takeiri M, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H, Ikeda K, Asagiri M, Uemoto S (2013) Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Hepato Res* April 19, e-pub ahead of print
 116. Santos M, Celotto AC, Capellini VK, Evora PR, Piccinato CE, Joviliano EE (2012) The protective effect of cilostazol on isolated rabbit femoral arteries under conditions of ischemia and reperfusion: the role of the nitric oxide pathway. *Clinics* 67:171–178
 117. Schmeding M, Boas-Knoop S, Lippert S, Ruehl M, Somasundaram R, Dagdelen T, Neuhaus P, Neumann UP (2008) Erythropoietin promotes hepatic regeneration after extended liver resection in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 23:1125–1131
 118. Schrör K (2002) The pharmacology of cilostazol. *Diabetes Obes Metab* 4:S14–S19
 119. Semenza GL (2010) HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 20:51–56
 120. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, López CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG (2013) Inflammation and host response to injury, Large Scale Collaborative Research Program, 2013. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:3507–3512
 121. Shin HK, Lee HR, Lee DH, Hong KW, Lee JH, Park SY, Lee SJ, Lee JS, Lee WS, Rhim BY, Kim CD (2010) Cilostazol enhances neovascularization in the mouse hippocampus after transient forebrain ischemia. *J Neurosci Res* 88:2228–2238

122. Tsung-Ming L, Sheng-Fang S, Chang-Her T, Yuan-The L, Shoei-Shen W (2001) Differential effects of cilostazol and pentoxifylline on vascular endothelial growth factor in patients with intermittent claudication. *Clin Sci* 101:305–311
123. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer J Clin* 62:10–29
124. Slotta JE (2006) Reduktion der Endotoxin-induzierten hepatischen Mikrozirkulationsstörung und Organdysfunktion durch Präkonditionierung mit CPG-Oligodeoxynukleotiden (CPG-ODN). Dissertationsschrift, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
125. Sperling J (2007) Isolierte hepatische Perfusion und hepato-arterielle Infusion von Tumor Nekrose Faktor alpha. Dissertationsschrift, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
126. Sperling J, Schäfer T, Benz-Weißer A, Ziemann C, Scheuer C, Kollmar O, Schilling MK, Menger MD (2013) Hepatic arterial infusion but not systemic application of cetuximab in combination with oxaliplatin significantly reduces growth of CC531 colorectal rat liver metastases. *Int J Colorectal Dis* 28:555–562
127. Sperling J, Schäfer T, Ziemann C, Benz-Weißer A, Kollmar O, Schilling MK, Menger MD (2012) Hepatic arterial infusion of bevacizumab in combination with oxaliplatin reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases. *Clin Exp Metastasis* 29:91–99
128. Sprague RS, Bowles EA, Achilleus D, Stephenson AH, Ellis CG, Ellsworth ML (2011) A selective phosphodiesterase 3 inhibitor rescues low PO₂-induced ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes: implication for vascular control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H2466–H2472
129. Stadelmann C, Lassmann H (2000) Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 301:19–31
130. Strandness DE Jr, Dalman RL, Panian S, Rendell MS, Comp PC, Zhang P, Forbes WP (2002) Effect of cilostazol in patients with intermittent claudication: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Vasc Endovascular Surg* 36:83–91
131. Tachimori A, Yamada N, Sakate Y, Yashiro M, Maeda K, Ohira M, Nishino H, Hirakawa K (2005) Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 41:1802–1810
132. Tamai Y, Takami H, Nakahata R, Ono F, Munakata A (1999) Comparison of the effects of acetylsalicylic acid, ticlopidine and cilostazol on primary hemostasis using a quantitative bleeding time test apparatus. *Haemostasis* 29:269–276
133. Tata PN, Fu C-HJ, Browder NJ, Chow PC, Bramer SL (1998) The quantitative determination of cilostazol and its four metabolites in human liver microsomal incubation mixtures by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 18:441–451

134. Taub R (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:836–847
135. Taylor I (1996) Liver metastases from colorectal cancer: lessons from past and present clinical studies. *Br J Surg* 83:456–460
136. Turnbull DH, Ramsay JA, Shivji GS, Bloomfield TS, From L, Sauder DN, Foster FS (1996) Ultrasound backscatter microscope analysis of mouse melanoma progression. *Ultrasound Med Biol* 22:845–853
137. Uzawa K, Kasamatsu A, Baba T, Usukura K, Saito Y, Sakuma K, Iyoda M, Sakamoto Y, Ogawara K, Shiiba M, Tanzawa H (2013) Targeting phosphodiesterase 3B enhances cisplatin sensitivity in human cancer cells. *Cancer Med* 2:40–49
138. Uzun MA, Koksall N, Kadioglu H, Gunerhan Y, Aktas S, Dursun N, Sehirli AO (2009) Effects of N-acetylcysteine on regeneration following partial hepatectomy in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Surg Today* 39:592–597
139. Van de Bovenkamp M, Groothuis GMM, Meijer DKF, Olinga P (2007) Liver fibrosis in vitro: Cell culture models and precision-cut liver slices. *Toxicol in Vitro* 21:545–557
140. Vauthey J-N, Pawlik TM, Ribero D, Wu T-T, Zorzi D, Hoff PM, Xiong HQ, Eng C, Lauwers GY, Mino-Kenudson M, Risio M, Muratore A, Capussotti L, Curley SA, Abdalla EK (2006) Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol* 24:2065–2072
141. Wang F, Li M, Cheng L, Zhang T, Hu J, Cao M, Zhao J, Guo R, Gao L, Zhang X (2008) Intervention with cilostazol attenuates renal inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 83:828–835
142. Wang H, Dwyer-Lindgren L, Lofgren KT, Rajaratnam JK, Marcus JR, Levin-Rector A, Levitz CE, Lopez AD, Murray CJ (2012) Age-specific and sex-specific mortality in 187 countries, 1970–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2071–2094
143. Wang P, Ba ZF, Burkhardt J, Chaudry IH (1992) Measurement of hepatic blood flow after severe hemorrhage: lack of restoration despite adequate resuscitation. *Am J Physiol* 262:G92–G98
144. Wang Q, Luan W, Goz V, Burakoff SJ, Hiotis SP (2011) Non-invasive in vivo imaging for liver tumour progression using an orthotopic hepatocellular carcinoma model in immunocompetent mice. *Liver Int* 31:1200–1208
145. Wechsel HW, Feil G, Bichler KH, Beiter T, Gleichmann R (2000) Serologic angiogenesis factors and microvascular density in renal cell carcinoma: two independent parameters. *Anticancer Res* 20:5117–5120
146. Weintraub WS (2006) The vascular effects of cilostazol. *Can J Cardiol* 22:56B–60B

147. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CH, Lopez MJ (1986) Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol* 150:195–203
148. Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ, others (2002) The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 89:1089–1095
149. Wicherts DA, Miller R, de Haas RJ, Bitsakou G, Vibert E, Veilhan L-A, Azoulay D, Bismuth H, Castaing D, Adam R (2008) Long-term results of two-stage hepatectomy for irresectable colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg* 248:994–1005
150. Wirtzfeld LA, Graham KC, Groom AC, Macdonald IC, Chambers AF, Fenster A, Lacefield JC (2006) Volume measurement variability in three-dimensional high-frequency ultrasound images of murine liver metastases. *Phys Med Biol* 51:2367–2381
151. Wirtzfeld LA, Wu G, Bygrave M, Yamasaki Y, Sakai H, Moussa M, Izawa JI, Downey DB, Greenberg NM, Fenster A, Xuan JW, Lacefield JC (2005) A new three-dimensional ultrasound microimaging technology for preclinical studies using a transgenic prostate cancer mouse model. *Cancer Res* 65:6337–6345
152. World Health Organization (2008) *Global Burden of Disease (The). 2004 Update*. WHO Press, Schweiz
153. Yamaguchi K, Kawahara T, Kumakura S, Hua J, Kugimiya T, Nagaoka I, Inada E (2010) Effect of olprinone, a phosphodiesterase III inhibitor, on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Shock* 33:436–441
154. Yardimci S, Bostanci EB, Ozer I, Dalgic T, Surmelioglu A, Aydog G, Akoglu M (2012) Sildenafil accelerates liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Transplant Proc* 44:1747–1750
155. Zheng ZJ, Sharrett AR, Chambless LE, Rosamond WD, Nieto FJ, Sheps DS, Dobs A, Evans GW, Heiss G (1997) Associations of ankle-brachial index with clinical coronary heart disease, stroke and preclinical carotid and popliteal atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis* 131:115–125
156. Zhong H, Li R, Hao Y, Guo Y, Hua X, Zhang X, Chen Z (2010) Inhibition effects of high mechanical index ultrasound contrast on hepatic metastasis of cancer in a rat model. *Acad Radiol* 17:1345–1349

10 Publikationen

Originalarbeit

Strowitzki MJ*, Dold S*, von Heesen M, Körbel C, Scheuer C, Moussavian MR, Schilling MK, Kollmar O, Menger MD (2014) The phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol does not stimulate growth of colorectal liver metastases after major hepatectomy. *Clin Exp Metastasis* 31:795–803. [**equal contribution*]

Publizierte Abstracts

Dold S, **Strowitzki M**, Müller S, von Heesen M, Kollmar O, Menger MD, Schilling MK, Moussavian MR (2011) Cilostazol stimulates liver regeneration but not growth of colorectal liver metastases after major liver resection. *Langenbecks Arch Surg* 396:871–936

Strowitzki M, Moussavian MR, Dold S, von Heesen M, Schilling MK, Menger MD, Kollmar O (2012) After major liver resection cilostazol stimulates liver regeneration but not growth of residual colorectal liver metastases. *J Cancer Res Clin Oncol* 138:2–162

Kongressbeiträge

Rapid Oral Presentation in der Session „GI-Tumore“; Deutscher Krebs-Kongress; Berlin (2012) Thema: “After major liver resection cilostazol stimulates liver regeneration but not growth of residual colorectal liver metastases”.

Posterbeitrag 8th World Congress on Peritoneal Surface Malignancies; Berlin (2012) Thema: “After major liver resection cilostazol stimulates liver regeneration but not growth and vascularization of residual colorectal liver metastases”.

11 Dank

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei den folgenden Personen bedanken. Ohne ihre Hilfe und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht entstanden:

Zuallererst danken möchte ich *Professor Dr. med. Michael D. Menger*, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes. Sein wissenschaftliches Verständnis und die Art und Weise Daten zu analysieren und zu evaluieren, haben mich umfassend geprägt. In zahlreichen Diskussionen hatte er stets Zeit für mich und sparte nie mit konstruktiver Kritik und Unterstützung. Ich lernte so präzise wissenschaftlich zu arbeiten und vor allem exakt wissenschaftlich zu schreiben. Dadurch bestärkte er mein Interesse, mich in der akademischen Chirurgie zu betätigen.

Genauso herzlich möchte ich mich bei *PD. Dr. med. Mohammed R. Moussavian*, Oberarzt der Gefäßchirurgie, St. Bonifatius Hospital Lingen, bedanken. Ihm verdanke ich die Überlassung des Themas meiner Dissertationsschrift und er war für mich stets ein wichtiger Ansprechpartner. Er ist für mich ein bedeutendes Vorbild für Loyalität, Ehrgeiz und ärztliches Handeln. Zudem bestärkte er mich in meinem Wunsch Chirurg zu werden. Ohne sein Zutun und seine exzellente Betreuung wäre ich nicht soweit gekommen.

Des Weiteren möchte ich mich bei *Stefan Dold* und *Dr. med. Maximilian von Heesen*, Oberarzt an der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, bedanken. Beide betreuten und unterstützten mich bei der Durchführung der experimentellen Operationen. Vor allem Dr. von Heesen prägte mich dabei in unzähligen Stunden nachhaltig. Seine Fähigkeit sich hundertprozentig auf eine Sache zu konzentrieren und seine Ausdauer bei der Versuchsdurchführung beeindruckten mich zutiefst. Heute schätze ich ihn als wertvollen Kollegen und Freund.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie bedanken. Vor allem danke ich *Janine Becker* für ihre Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Schnitte und der immunhistochemischen Färbungen. Natürlich bedanke ich mich ebenso für die Hilfe von *Christina Körbel* und die Durchführung der Ultraschalluntersuchungen. Zusätzlich bedanke ich mich bei *Claudia Scheuer* und *Christina Marx*, die mich bei den molekularbiologischen Untersuchungen und bei der

Anzüchtung der Tumorzellen unterstützt haben. Bedanken möchte ich mich weiterhin bei *Ulrich Keppler*, der mir damals und heute zu jeder Zeit Freund und Kollege ist und mich stets ermutigte.

Am Ende möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, meinen Freunden und vor allem bei meiner Frau *Sandra* und meinem Sohn *Rafael* bedanken. Ohne deren Geduld und liebevolle Unterstützung könnte ich nicht den Beruf ausüben, der mich so sehr fasziniert.

12 Lebenslauf

Der Lebenslauf wird in der elektronischen Version der vorliegenden Arbeit nicht veröffentlicht.