

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
(Direktor Universitätsprofessor Dr. med. Claus-Dieter Heidecke)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität

**Der Einfluss von Makrophagen auf das Wachstums- und
Metastasierungsverhalten in einem orthotopen, syngenem
Kolonkarzinommodell in der Balb/c-Maus**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2018

vorgelegt von: Johannes Friedrich Kruse
geb. am 21.5.1985 in Bremen

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfram von Bernstorff

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Walter Heise

Greifswald, den 03.12.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Kolonkarzinom	1
1.2 Tumor-assoziierte Makrophagen	2
1.3 Kupffer-Zellen	4
1.4 MRT-Bildgebung des Kolons	6
1.5 Zielstellung	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Tiere	9
2.2 Zelllinie	9
2.3 Clodronat-Liposomen	10
2.4 Zytotoxizitätsassay	12
2.5 Kolonkarzinommodell	13
2.5.1 Induktion eines orthotopen Kolonkarzinoms	13
2.5.2 MRT-Bildgebung im orthotopen Kolonkarzinommodell	15
2.5.3 Versuchsablauf im orthotopen Kolonkarzinommodell	17
2.6 Lebermetastasenmodell	19
2.6.1 Induktion von Lebermetastasen	19
2.6.2 MRT-Bildgebung im Lebermetastasenmodell	20
2.6.3 Versuchsablauf im Lebermetastasenmodell	21
2.7 HE-Färbung	22
2.8 Immunhistochemie	23
2.8.1 F4/80-Färbung	23
2.8.2 CD31-Färbung	26
2.9 Weitere Untersuchungen zur Verbesserung der Bildgebung des Darmes der Maus im MRT	26
2.9.1 MRT-Bildgebung mit Kontrastierung des Darmlumens	27
2.9.2 MRT-Bildgebung mit Kontrastierung der Darmwand	29
2.10 Statistik	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Zytotoxizitäts-Assay	31
3.2 Orthotopes Kolonkarzinommodell	31
3.3 Lebermetastasenmodell	40
3.4 Untersuchungen zur Verbesserung der MRT-Bildgebung des Darmes in der Maus	50

4 Diskussion	54
5 Zusammenfassung	66
Literaturverzeichnis	68
Eidesstattliche Erklärung	76
Danksagung	77

Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous Polyposis Coli
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
Balb/c	Bagg albino strain c
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	Kalifornien
CD	Cluster of Differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cm	Zentimeter
CSF-1	Colony Stimulating Factor-1
CT	Computertomographie
CT-26	Colon Tumour 26
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
EU	Europäische Union
FA	Flip Angle (Anregungswinkel)
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FoV	Field of View (Bildbereich)
g	Gramm
G	Gauge
Gd	Gadolinium
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HE	Hämatoxylin und Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter
MCP-1	Macrophage Chemoattractant Protein-1
MD	Maryland

mg	Milligramm
min	Minute
MIPAV	Medical Imaging Processing And Visualization
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mmol	Millimol
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
mTesla	Millitesla
NaCl	Natriumchlorid
OP	Operation
p53	Protein 53
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
pH	potentia Hydrogenii
ras	Rat sarcoma
ROI	Region of Interest
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TE	Echo Time
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TM	Trademark
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TR	Repetition Time
UICC	Union international contre le cancer
USA	United States of America
USP	United States Pharmacopeia
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vibe	Volumetric interpolated breathhold examination
WI	Wisconsin
z.B.	zum Beispiel
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Kolonkarzinom

Das kolorektale Karzinom ist heutzutage bei Frauen und Männern die zweit- bzw. dritthäufigste maligne Tumorerkrankung in der westlichen Welt. Etwa jeder zwanzigste in den Industrienationen lebende Mensch, wird im Laufe seines Lebens an einem kolorektalen Karzinom erkranken. Allein in Deutschland treten jedes Jahr etwa 62.000 Neuerkrankungen auf. Gleichzeitig stellt das kolorektale Karzinom mit jährlich etwa 26.000 Sterbefällen auch eine der häufigsten Krebstodesursachen in der Bundesrepublik dar^{1,2}.

Das Kolonkarzinom ist eine Erkrankung des späteren Lebensalters. 90% aller Betroffenen sind zum Zeitpunkt der Diagnose älter als 50 Jahre. Männer erkranken im Mittel mit 70 Jahren, Frauen in etwas fortgeschrittenerem Alter, mit 73 Jahren. Ätiologisch spielen eine fettreiche und ballaststoffarme Ernährung, der Verzehr von rotem Fleisch, sowie Übergewicht, Bewegungsmangel, Rauchen und Alkoholkonsum eine Rolle bei der Entstehung kolorektaler Karzinome²⁻⁴.

Der Großteil der kolorektalen Karzinome entsteht sporadisch (88-94%)³. Hierbei stellt die Entwicklung über die Adenom-Karzinom-Sequenz die Grundlage für die Entstehung eines Kolonkarzinoms dar⁵. Über die Akkumulation von Mutationen u.a. im APC-, ras- und p53-Gen entsteht sequentiell aus gesundem Darmepithel über Adenome mit unterschiedlichen Dysplasiegraden ein invasives Karzinom. Aufgrund der langsamen Entstehung über Vorstufen mit zunehmender Entartungstendenz, kommt der Vorsorgekoloskopie eine entscheidende Rolle bei der Prävention zu^{3,6}.

Viel seltener als die sporadischen Karzinome entstehen Kolonkarzinome aufgrund hereditärer Erkrankungen (5-10%). In diese Gruppe gehören das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) beim Lynch-Syndrom sowie das Karzinom im Rahmen der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP). Noch seltener sind Kolonkarzinome, die sich auf dem Boden einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (1-2%) wie der Colitis ulcerosa entwickeln^{3,6}.

Die Mehrzahl der kolorektalen Karzinome entsteht im Bereich des Rektums (45%) und des Colon sigmoideums (30%). Ein vergleichsweise kleinerer Anteil entsteht im Colon ascendens (12,5%), im Colon transversum (9,5%), sowie im Colon descendens (2%)⁷.

Histologisch stellen Adenokarzinome mit Abstand die häufigste Tumorentität des Dickdarmes dar. Zu den selteneren, hier vorkommenden Karzinomen zählen muzinöse Adenokarzinome, Siegelringkarzinome, Plattenepithelkarzinome, adenosquamöse und neuroendokrine Karzinome⁸.

In frühen Tumorstadien können Patienten mit einem Kolonkarzinom durch eine alleinige Operation behandelt und geheilt werden, an die sich, in weiter fortgeschrittenen Stadien, eine Chemotherapie anschließen kann. Bei der Behandlung des Rektumkarzinoms stellt die prä- oder postoperative Radiochemotherapie eine weitere Möglichkeit zur Ergänzung der operativen Therapie dar^{3,8}.

Entscheidend für die Prognose des kolorektalen Karzinoms sind die Infiltrationstiefe des Tumors, der Befall von Lymphknoten und das Auftreten von Fernmetastasen. Während Patienten in einem frühen Stadium (UICC I) mit 85-95% eine sehr gute Prognose haben, nimmt die 5-Jahresüberlebenschance mit fortgeschrittenerem Tumorstadium und dem Auftreten von Metastasen stetig ab (UICC II 60-80%, III 30-50%, IV 5-15%)^{8,9}. Da das abfließende venöse Blut aus dem Tumorgebiet über die Pfortader zunächst die Leber erreicht, stellt die Leber die häufigste Lokalisation für Fernmetastasen dar. Etwa 30% bis 55% der Patienten entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung Lebermetastasen. Während der Großteil der Patienten mit einer Lebermetastasierung nicht operabel und somit nicht mehr kurativ behandelbar ist, stellt die Metastasenresektion bei Patienten mit isolierten Lebermetastasen und funktioneller Operabilität eine Möglichkeit zur Heilung dar, mit 5-Jahresüberlebensraten zwischen 25% bis 40%⁹⁻¹⁴.

1.2 Tumor-assoziierte Makrophagen

Solide Tumoren, wie auch das kolorektale Karzinom, bestehen nicht nur aus malignen Zellen, sondern darüber hinaus aus einer Vielzahl anderer Zellarten wie z.B. Fibroblasten, Endothelzellen und Leukozyten. Makrophagen, als Untergruppe der Leukozyten, stellen einen wesentlichen Teil des leukozytären Infiltrates in malignen Tumoren dar¹⁵⁻¹⁷. Sie gehören zum unspezifischen bzw. angeborenen Teil des Immunsystems und entwickeln sich aus Monozyten, die aus dem Knochenmark in die Blutbahn ausgeschwemmt werden und von dort in die umliegenden Gewebe einwandern, wo sie zu Makrophagen differenziert

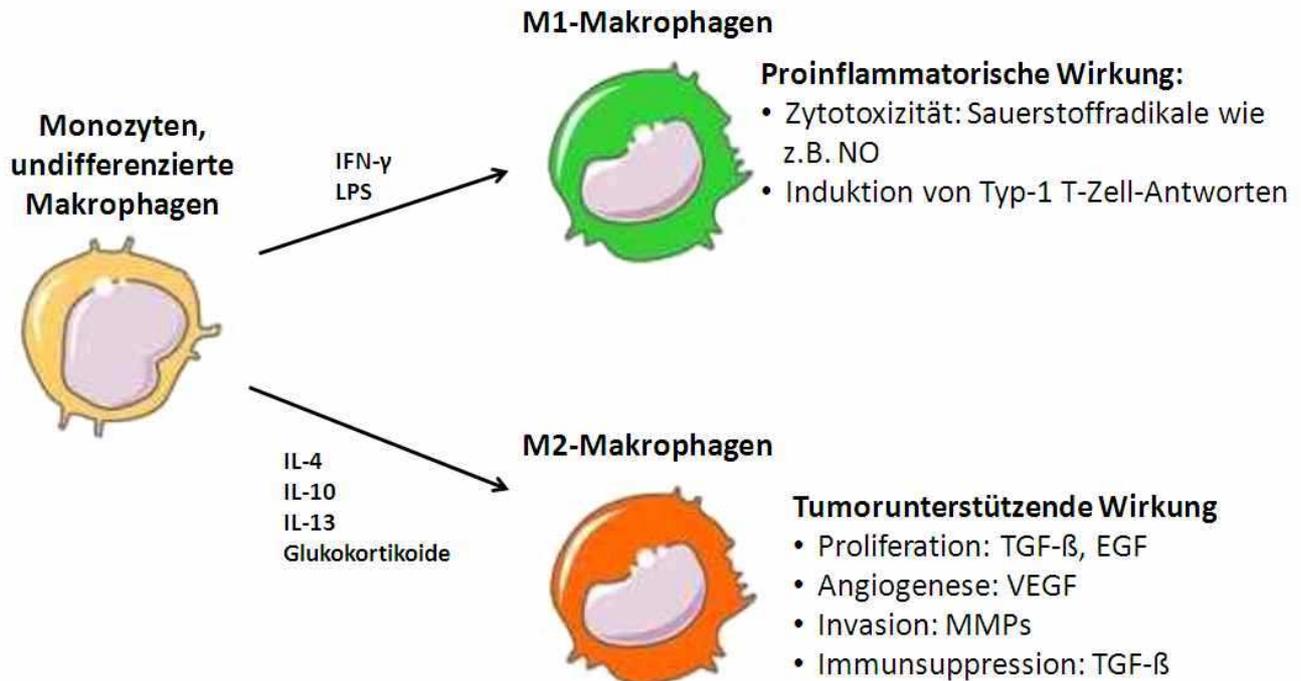


Abb. 1 M1/M2-Differenzierung von Makrophagen Undifferenzierte Monozyten oder Makrophagen können durch bestimmte Reize in proinflammatorische (M1) bzw. tumor-assoziierte (M2) Makrophagen differenziert werden.

werden^{18,19}. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass sich Makrophagen durch bestimmte Stimuli in zwei spezifische Subtypen differenzieren können, sogenannte M1- und M2-Makrophagen, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden. M1-Makrophagen sind proinflammatorische oder sogenannte klassisch-aktivierte Makrophagen, die in der Lage sind, Antigene zu präsentieren, Typ-1 T-Zell-Antworten zu induzieren und unter anderem proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF- α sowie verschiedene Radikale auszuschütten, die zytotoxische Effekte auf Mikroorganismen und Tumorzellen haben können. Die Stimulation undifferenzierter Makrophagen oder Monozyten mit Interferon- γ oder Lipopolysacchariden führt zur Differenzierung in M1-Makrophagen¹⁹⁻²³.

M2-Makrophagen sind alternativ-aktivierte oder tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs), die durch bestimmte, unter anderem von Tumoren sezernierte Stoffe wie VEGF und MCP-1 in Tumoren gelockt und durch Zytokine wie IL-4, -10 und -13 sowie Glukokortikoide, zu M2-Makrophagen differenziert werden können^{19,20,22,24-26}. Im Gegensatz zu M1-Makrophagen besitzen tumor-assoziierte oder M2-Makrophagen nicht mehr die Eigenschaft, zytotoxische

Radikale zu sezernieren, Typ-1 T-Zell-Antworten zu aktivieren oder Antigene zu präsentieren. Stattdessen produzieren sie Substanzen, die das Tumorstadium steigern, wie zum Beispiel EGF und TGF- β . Eine weitere Wirkung besteht in der Förderung der Angiogenese durch Sekretion von VEGF und dem Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Darüber hinaus können tumor-assoziierte Makrophagen proteolytische Enzyme, wie zum Beispiel verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMP-2, -9, -12) sezernieren, die zu einem Abbau der extrazellulären Matrix beitragen. Hierdurch leisten sie einen Beitrag zu weiterem Tumorstadium, sowie zur Infiltration des Tumors in Gefäße und fördern dadurch die Metastasierungsfähigkeit des Tumors (Abb. 1)^{19,24,27-30}.

Eine Reihe von Studien hat bisher den Einfluss von tumor-assoziierten Makrophagen auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten von verschiedenen Tumorentitäten untersucht. Die Mehrzahl der Veröffentlichungen beschrieb hierbei einen wachstums- und metastasierungsfördernden Effekt wie zum Beispiel für das Pankreas-, Mamma-, Blasen-, Prostata- und hepatozelluläre Karzinom³¹⁻³⁷. Einige andere Publikationen berichteten allerdings von einem gegenteiligen Einfluss tumor-assoziierten Makrophagen. In diesen Studien zeigte die Infiltration von Makrophagen in die Tumoren einen positiven Effekt auf die Prognose von Magen- und Bronchialkarzinomen^{38,39}.

Bezüglich der Rolle tumor-assoziierten Makrophagen beim Kolonkarzinom im Menschen wurden bisher widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht. Einige Forschungsgruppen beobachteten, dass eine hohe Makrophagendichte entlang der Invasionsfront des Tumors mit einem früheren Tumorstadium, einer besseren Differenzierung des Tumors, weniger befallenen Lymphknoten und einer insgesamt besseren Prognose korrelierte⁴⁰⁻⁴².

Andere Studien zeigten hingegen anhand humaner Kolonkarzinompräparate, dass die Infiltration tumor-assoziierten Makrophagen mit einer schlechteren Differenzierung, fortgeschritteneren Tumorstadien, einer verstärkten Neoangiogenese und einer höheren Rate an befallenen Lymphknoten assoziiert war^{26,43,44}.

1.3 Kupffer-Zellen

In der Leber, dem Ort der häufigsten Lokalisation von Fernmetastasen kolorektaler Karzinome, stellen die ortsständigen Makrophagen, die sogenannten Kupffer-Zellen, mit 10-

15% die zweitgrößte Zellpopulation nach den Hepatozyten dar. Sie befinden sich im Lumen der Lebersinusoide und stehen somit in direktem Kontakt zu den im Blut zirkulierenden Tumorzellen⁴⁵⁻⁴⁹.

Die Aufgabe der Kupffer-Zellen besteht darin, Mikroorganismen, apoptotische Zellen, Erythrozyten und Abfallprodukte aus dem die Lebersinusoide durchströmenden Blut und dem Lebergewebe per Phagozytose zu entfernen. Darüber hinaus sind sie in der Lage proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, proteolytische Enzyme und reaktive Sauerstoffradikale freizusetzen und hierdurch unter anderem auf Pathogene, Medikamente, sowie Tumorzellen zu reagieren. Außerdem besitzen sie, genau wie M1-Makrophagen, die Fähigkeit, Antigene zu präsentieren und T-Zell-Antworten zu induzieren, sowie intrahepatische Immunreaktionen anzustoßen^{46,47,50-53}.

Eine Reihe von Studien hat bereits den Einfluss von Kupffer-Zellen auf die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms untersucht. Doch genau wie bei den tumor-assoziierten Makrophagen im Kolonkarzinom, wurden auch hier bisher gegensätzliche Ergebnisse publiziert, sodass die Rolle der Kupffer-Zellen bei der Entstehung von Lebermetastasen noch nicht abschließend geklärt ist.

In einigen Veröffentlichungen wurde Kupffer-Zellen eine Metastasen-verhindernde Wirkung zugesprochen, da sie in der Lage waren, einen Großteil der zirkulierenden Tumorzellen zu binden und durch Phagozytose oder Sekretion von TNF- α und zytotoxischen Radikalen abzutöten⁵⁴⁻⁵⁹.

Andere Forschungsergebnisse wiesen jedoch darauf hin, dass Kupffer-Zellen im Gegenteil sogar die Entstehung von Lebermetastasen förderten, indem sie zwar die Tumorzellen banden, jedoch nicht in der Lage waren, alle Tumorzellen auch abzutöten. Von diesen gebundenen, aber nicht phagozytierten Tumorzellen könnte die Metastasenausbildung ihren Ursprung nehmen^{47,55,60}. Darüber hinaus wurde bei Kupffer-Zellen die Fähigkeit beobachtet, die Expression bestimmter Rezeptoren auf dem Endothel der Lebersinusoide zu induzieren, an die wiederum Tumorzellen binden konnten. Dies könnte der Ursprung für die Migration von Tumorzellen in das Lebergewebe und die Bildung von Metastasen sein⁶¹⁻⁶³.

1.4 MRT-Bildgebung des Kolons

Das MRT, oder auch Kernspintomographie genannt, ist eine Methode der Bildgebung, bei der Schichtbilder des Körpers ohne Verwendung von Röntgenstrahlung angefertigt werden. Hierbei macht man sich den Eigendrehimpuls (Kernspin) von Wasserstoffatomen zu Nutze, die durch Anlegen eines äußeren, starken Magnetfeldes ausgelenkt werden. Nach Abschalten des Magnetfeldes fallen die Wasserstoffatome wieder in ihren ursprünglichen Eigendrehimpuls, unter Aussendung elektromagnetischer Strahlung, zurück. Diese Strahlung kann gemessen und zur Bildkonstruktion verwendet werden.

Der Vorteil der Magnetresonanztomographie gegenüber anderen bildgebenden Verfahren, wie z.B. der Computertomographie, besteht in einem sehr guten Weichteilkontrast, einer hohen Auflösung, der Möglichkeit zur Generierung von Bildern in jeder Ebene im Raum, sowie dem Verzicht auf Röntgenstrahlung. Darüber hinaus stellt sie, im Gegensatz zur Koloskopie oder Endosonographie, ein nicht-invasives Verfahren dar.

Die Diagnose eines kolorektalen Karzinoms erfolgt im Menschen durch eine endoskopische Untersuchung (Koloskopie) mit Biopsieentnahme zur histologischen Bestätigung der Malignität. Zur Festlegung des Tumorstadiums werden weitere bildgebende Untersuchungsmethoden (Sonographie, Endosonographie, CT, MRT) eingesetzt, die insbesondere beim Rektumkarzinom Aussagen zur Tiefe der Wandinfiltration des Tumors und zu einem möglichen Lymphknotenbefall erlauben^{3,64}. Bei der Untersuchung der Leber zur Darstellung einer möglichen Metastasierung spielt das MRT unter Verwendung des leberspezifischen Kontrastmittels Primovist® eine zentrale Rolle⁶⁵⁻⁶⁷.

Tiermodelle zur Untersuchung von humanen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Kolonkarzinom, stehen in steigender Zahl zur Verfügung. Hierbei kommt den bildgebenden Verfahren zur nicht-invasiven Verlaufsbeurteilung eine entscheidende Bedeutung zu. In der Klinik erfolgreich angewendete Verfahren, wie die Computertomographie oder die Magnetresonanztomographie, haben sich auch im Kleintiermodell für bestimmte Fragestellungen bewährt. Heutzutage wird die MRT-Bildgebung beispielsweise des Herzens und des Gehirns im Tiermodell bereits erfolgreich und standardmäßig angewendet, wohingegen das MRT des Abdomens aufgrund technischer Schwierigkeiten, bedingt durch die Peristaltik und Atembewegungen, bislang oft noch zu unbefriedigenden Ergebnissen führt⁶⁸⁻⁷⁰. Während das Rektum durch seine anatomische Fixierung und die dadurch

eingeschränkte Beweglichkeit meist noch gut darstellbar ist, ist die Bildgebung des Kolons und des Dünndarms bei lebenden Tieren ohne Hilfsmittel bisher schwierig^{71,72}. Obwohl prinzipiell auch die Koloskopie im Kleintiermodell zur Verfügung steht, stellt dieses Verfahren zur Diagnostik bzw. zur Verlaufsbeurteilung von Erkrankungen des Darmes eine nur eingeschränkt anwendbare Methode dar, da unter anderem lediglich die distalen 3-4cm des Darmes untersucht werden können⁷³.

Da viele Erkrankungen des Darmes, wie z.B. auch die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, noch nicht vollständig verstanden werden, benötigt die Forschung auch in Zukunft Tierversuche, um sowohl die Ursachen, als auch potenzielle Behandlungsmöglichkeiten zu untersuchen. Hierbei könnte eine verbesserte Bildgebung des Darmes im MRT in vielen Tierversuchen den Informationsgehalt steigern, gleichzeitig eine nicht-invasive, zeitliche Verlaufsbeurteilung ermöglichen und darüber hinaus für bestimmte Fragestellungen die Anzahl der benötigten Versuchstiere reduzieren, gemäß dem von Russel und Burch publizierten 3R-Prinzip (Reduction (Verminderung), Replacement (Ersetzen), Refinement (Verfeinerung/Verbesserung))⁷⁴.

1.5 Zielstellung

Für mehrere Tumorentitäten wurde sowohl im Kleintiermodell, als auch in humanen Präparaten bereits ein proliferationsfördernder Effekt durch Makrophagen nachgewiesen. Für das Kolonkarzinom wurden bisher nur wenige und darüber hinaus gegensätzliche Ergebnisse veröffentlicht. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Makrophagen auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten des Kolonkarzinoms, sowie die Rolle von Kupffer-Zellen auf die Entstehung von Metastasen in der Leber zu untersuchen. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen sollte ein Tiermodell verwendet und die Makrophagen selektiv mittels Gabe von Clodronat-Liposomen depletiert werden. Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten, Kolonkarzinome in Tieren zu erzeugen. Da die Tiere die Clodronat-Injektionen jedoch nur für einen kurzen Zeitraum tolerierten, wurde in dieser Arbeit ein Tumormodell benötigt, in dem die Versuchstiere innerhalb eines kurzen Zeitraums zuverlässig Kolonkarzinome entwickelten. Zu diesem Zweck wurde ein orthotopes, syngenes

Kolonkarzinommodell in der immunkompetenten Maus etabliert und das Tumorwachstum in Versuchsgruppen mit und ohne Makrophagendepletion mittels Kleintier-MRT untersucht.

Für den Fall eines signifikanten Einflusses der Makrophagen auf das Wachstumsverhalten im orthotopen Kolonkarzinom war es darüber hinaus ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eine der hierfür möglicherweise verantwortlichen Ursachen, wie zum Beispiel die Beeinflussung der Neoangiogenese, genauer zu untersuchen.

In einem zweiten Tiermodell, einem Lebermetastasenmodell, sollte außerdem die Rolle von Kupffer-Zellen bei der Lebermetastasierung beobachtet werden. Auch hier wurden die Kupffer-Zellen selektiv durch Gabe von Clodronat-Liposomen depletiert und die Metastasierung im Anschluss mittels Kleintier-MRT beurteilt.

Im Versuchsverlauf zeigten sich bei der Bildgebung der orthotopen Kolonkarzinome im Kleintier-MRT erhebliche Schwierigkeiten aufgrund der nicht zu unterdrückenden Peristaltik. Daher war es neben den vorab formulierten Zielen im weiteren Verlauf darüber hinaus das Bestreben, eine Methode zu entwickeln, die eine schonende, nicht-invasive MRT-Darmbildgebung im Mausmodell zuverlässig ermöglicht.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

In sämtlichen Versuchen wurden 8 bis 10 Wochen alte, männliche Balb/c-Mäuse mit einem Gewicht von 22g bis 24g verwendet. Sie wurden über Charles River (Bad Sulzfeld, Germany) bezogen und im Tierstall der Arbeitsgemeinschaft für Chirurgische Onkologie im Biotechnikum in Greifswald in Kästen zu je maximal fünf Tieren gehalten. Die Tiere bekamen sterilisiertes Trockenfutter (ssniV R-Z, ssniV Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) sowie angesäuertes Wasser ad libitum. Die Mäuse waren einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt und wurden bei einer konstanten Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten. Vor Beginn der Versuche erhielten die Tiere eine Woche Zeit zur Gewöhnung an die neue Umgebung. Die Tierexperimente wurden zuvor vom Ethikkomitee des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei genehmigt (Antragsnummern LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-052/2010 sowie -082/2012).

2.2 Zelllinie

Zur Induktion eines orthotopen Kolonkarzinoms wurde die Kolonkarzinom-Zelllinie CT-26 verwendet, die ursprünglich 1975 in den USA in Balb/c-Mäusen chemisch induziert und anschließend isoliert wurde. Durch die transrektale Gabe von N-Nitroso-N-Methylurethan zweimal wöchentlich über sechs Monate entwickelten die Tiere Kolonkarzinome, die anschließend in gesunde Balb/c-Mäuse transplantiert wurden. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um undifferenzierte Karzinomzellen (Grad IV) mit einer Verdopplungszeit während der exponentiellen Wachstumsphase von 1,7 Tagen und einer hohen Metastasierungsrate^{75,76}.

Die Kultivierung der CT-26-Zellen erfolgte in 10cm Zellkulturschalen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, PAN™, Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland), sowie 100U/ml Penicillin (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) gehalten. Etwa alle zehn Tage, nachdem die Zellen einen konfluenten Zellrasen gebildet

hatten, wurden sie gesplittet. In den Versuchen wurden Zellen ab der dritten Passage verwendet. Mittels PCR wurden die Tumorzellen regelmäßig auf Mykoplasmen getestet und nur negativ getestete Zellkulturen weiterverwendet.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an der Zellkulturbank (Thermo Electron, Heraeus, Langenselbold, Deutschland) durchgeführt. Zum Splitten der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen vorsichtig durch fünfminütige Inkubation mit 1ml 0,05% Trypsin (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) abgelöst und in ein 15ml-Sarstedt-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Nach dem Zentrifugieren für 3 Minuten bei 1500U (Heraeus, Hanau, Deutschland) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 5ml frischem DMEM resuspendiert. 1ml dieser Suspension wurde in eine frische Zellkulturschale gegeben und mit 9ml DMEM, sowie FCS und Penicillin in oben genannten Konzentrationen versetzt. Alle 2-3 Tage wurde das Zellwachstum per Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) kontrolliert.

2.3 Clodronat-Liposomen

Zur Makrophagen-Depletion wurden Clodronat-Liposomen verwendet. Das Clodronat wurde freundlicherweise durch die Firma Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt und die Clodronat-Liposomen im Labor von Nico van Rooijen (Abteilung für Molekulare Zellbiologie, Medizinische Fakultät, Vrije Universität, Amsterdam, Niederlande) hergestellt. Clodronat-Liposomen sind Vesikel mit einer Doppellipidmembran, die in ihrem Inneren das Bisphosphonat Clodronat enthalten. Die Liposomen werden selektiv von Makrophagen phagozytiert und intrazellulär von lysosomalen Phospholipasen verdaut, sodass die Phospholipiddoppelschicht zerstört und das Clodronat freigesetzt wird, was letztlich zum Absterben der Zelle per Apoptose führt. Das hierbei freigesetzte Clodronat hat eine extrem kurze Halbwertszeit im Blutsystem, weil es umgehend renal ausgeschieden wird.

Bei der intraperitonealen Injektion gelangen die Liposomen in die Peritonealhöhle und von dort über das Lymphsystem in die Blutbahn, die sie nicht verlassen können. Eine einzige intraperitoneale Injektion von Clodronat-Liposomen führt somit zur selektiven Depletion von

Makrophagen innerhalb der Peritonealhöhle sowie in der Blutbahn einschließlich der in den Lebersinusoiden befindlichen Kupffer-Zellen⁷⁷⁻⁷⁹.

Die Liposomen wurden bei 4°C gelagert und vor der Injektion in die Mäuse auf Zimmertemperatur aufgewärmt. Vor der Injektion wurde das Falcon Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit den Liposomen vorsichtig geschüttelt, um eine homogene Injektionssuspension zu erhalten und ein Absetzen der Liposomen am Boden des Röhrchens zu verhindern. Die Liposomen wurden anschließend nach Desinfektion der Bauchdecke mit 70%-Ethanol unter sterilen Bedingungen mit einer 1ml-Spritze und einer 26G-Kanüle in die Bauchhöhle gespritzt.

Die Mäuse bekamen bei der ersten intraperitonealen Injektion eine Dosis von 2mg Clodronat pro 20g Körpergewicht appliziert. Dies entspricht einem Volumen von 286µl der Suspension pro 20g Körpergewicht. Da Monozyten bzw. Makrophagen nach etwa fünf Tagen wieder beginnen sich anzusiedeln, wurden die Injektionen alle fünf Tage mit der halben Ausgangsdosis (1mg Clodronat pro 20g KG) wiederholt. Im orthotopen Kolonkarzinommodell wurde die erste Injektion von Clodronat-Liposomen zwei Tage nach der Tumorzellinjektion durchgeführt. Weil die Clodronat-Liposomen bei diesem Injektionsschema zu einer Depletion der Monozyten und Makrophagen in der Peritonealhöhle und der Blutbahn führen, nicht aber in der Darmwand bzw. im Tumor selbst, war bei diesem Vorgehen nicht mit einer vollständigen Depletion in den Kolonkarzinomen zu rechnen, da dort bereits ansässige Makrophagen nicht erreicht werden konnten. In diesem orthotopen Modell ließ sich durch Injektion der Clodronat-Liposomen somit lediglich die Neueinwanderung von Monozyten und Makrophagen aus der Peritonealhöhle und der Blutbahn verhindern.

Im Lebermetastasenmodell erfolgte die intraperitoneale Injektion von Clodronat-Liposomen zwei Tage vor der Tumorzellinjektion in die Milz, sodass die Kupffer-Zellen zum Operationszeitpunkt bereits vollständig depletiert waren. In Vorversuchen zeigte sich dieses Injektionsschema als hocheffektiv zur Depletion der Kupffer-Zellen in der Leber.

Viele Forschungsgruppen verwenden mit PBS gefüllte Liposomen als Kontrolle. Dies ist aber nicht die wissenschaftlich korrekte Kontrolle für die Applikation von Clodronat-Liposomen, weil die Liposomen allein bereits einen möglichen Effekt auf Makrophagen haben können. Hierzu zählt die Blockierung bestimmter Makrophagenfunktionen, wie z.B. der Phagozytose

durch die PBS-Liposomen. Aus diesem Grund wird meist empfohlen, die intraperitoneale Injektion von NaCl als Kontrolle zu verwenden⁷⁷.

Da die Versuche im Lebermetastasenmodell in dieser Arbeit zeitlich vor denen des orthotopen Kolonkarzinommodells durchgeführt worden waren, wurden in dem zuerst genannten Modell zwei Kontrollgruppen verwendet. Eine Tiergruppe erhielt PBS-Liposomen, die andere lediglich NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland) intraperitoneal. Die Injektionen erfolgten jeweils zu den gleichen Zeitpunkten und mit den gleichen Injektionsvolumina wie in der Gruppe, die Clodronat-Liposomen erhalten hatte. Nachdem im Lebermetastasenmodell kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen zu erkennen war, wurde im orthotopen Kolonkarzinommodell auf eine Kontrollgruppe verzichtet, um die Anzahl an Versuchstieren im Sinne des 3R-Prinzips so niedrig wie möglich zu halten. Die Kontrollgruppe in diesem Experiment bekam lediglich NaCl intraperitoneal injiziert.

Die Makrophagendepletion mit Clodronat-Liposomen hat weitreichende Folgen für die Funktion des Immunsystems. Aus diesem Grund verstirbt ein Teil der Tiere an Infektionen. Bei Tieren, die im Verlauf der Versuche verendeten, wurde umgehend eine Exploration durchgeführt. Es konnte stets ausgeschlossen werden, dass eine hohe Tumorlast die Ursache für ihren Tod war.

2.4 Zytotoxizitätsassay

Um ausschließen zu können, dass die Clodronat-Liposomen selbst einen Effekt auf die Tumorzellen haben, wurde zunächst ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Hierzu wurden $2,5 \times 10^3$ CT-26 Tumorzellen pro Loch in einer 96-Loch-Platte (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) für 24h bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit zunächst mit 120µl DMEM versetzt. Im nächsten Schritt wurde das Medium abgenommen und durch frisches DMEM, DMEM mit 1:100 verdünnten Clodronat-Liposomen und DMEM mit 1:200 verdünnten Clodronat-Liposomen ersetzt. Nach weiteren 24h im Zellkulturschrank wurde die Zellvitalität mittels CellTiter Blue-Assay (CellTiter Blue[®], Promega, Madison, WI, USA) untersucht. Hierbei wird die Eigenschaft von vitalen Zellen ausgenutzt, die Indikatorsubstanz Resazurin zu der

fluoreszierenden Substanz Resorufin zu metabolisieren. Nicht-vitale Zellen verlieren diese Eigenschaft und erzeugen somit kein fluoreszierendes Signal.

Im Rahmen des Assays wurden die Zellen in den Löchern mit dem CellTiter-Blue-Reagenz versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die Platte mit einem Fluoreszenz-Photometer bei einer Exzitation von 545nm und einer Emission von 590nm (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) ausgelesen.

2.5 Kolonkarzinommodell

Zur Untersuchung des Einflusses von Makrophagen auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten im Kolonkarzinom wurde ein Tiermodell verwendet. Da die Mäuse die in Kapitel 2.3 beschriebenen Clodronat-Injektionen nur für einen begrenzten Zeitraum tolerierten, wurde ein Kolonkarzinommodell benötigt, bei dem die Tiere innerhalb weniger Wochen Tumoren ausbildeten. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein neues Injektionsmodell etabliert, bei dem Balb/c-Mäusen 5×10^4 CT-26-Kolonkarzinomzellen orthotop in die Darmwand des Caecums injiziert wurden.

2.5.1 Induktion eines orthotopen Kolonkarzinoms

Zur Vorbereitung der Tumorzellinjektion war es notwendig, die CT-26-Zellen zwei Tage vor der Operation bereits einmal zu splitten, weil die Zellen zur Verklumpung neigten und sich auch durch sorgfältiges Resuspendieren sonst nicht in die notwendige Einzelzellsuspension bringen ließen. Die Anzahl der Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer (Braun, Melsungen, Deutschland) bestimmt. Jeweils 5×10^5 CT-26-Zellen wurden abschließend in ein 1,5ml Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und mit DMEM-Medium aufgefüllt.

Die Operation selbst wurde im Tierstall der Forschungsgruppe Chirurgische Onkologie im Biotechnikum Greifswald durchgeführt. Hier wurden unmittelbar vor Operationsbeginn die Zellen in den vorbereiteten Eppendorf®-Röhrchen herunterzentrifugiert und das Medium abgenommen. Das Zellpellett wurde nun in 50µl PBS sowie 50µl Matrigel (Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Bioscience, San José, CA, USA) resuspendiert. Durch

Injektion von 10µl dieser Suspension erhielt jede Maus somit 5×10^4 Zellen. Das Matrigel® hat die Eigenschaft, unterhalb von 4°C in flüssiger Form vorzuliegen und beim Aufwärmen auf über 4°C in einen gelartigen Zustand überzugehen, welcher das Austreten von Tumorzellen aus der Darmwand minimiert.

Zur Induktion der Kolonkarzinome wurden die Tiere zunächst durch eine intraperitoneale Injektion mit einer Mischung aus Ketamin Hydrochlorid (Ketanest S®, Pfizer Pharma, Berlin) und Xylometazolin Hydrochlorid (Rompun®, Bayer HealthCare, Berlin) in einer Konzentration von 87mg/kg bzw. 13mg/kg anästhesiert. Hierzu wurden 27G-Kanülen (Braun, Melsungen Deutschland), sowie 1ml-Spritzen (Braun, Melsungen, Deutschland) verwendet. Die

Narkosetiefe wurde durch das Auslösen eines

Schmerzreflexes am Fuß überprüft. Sobald

sich eine ausreichende

Narkosetiefe

einstellte, wurden die

Tiere in Rückenlage

fixiert. Das Fell der

Mäuse wurde nun

mit einem in 70%-

Ethanol getränktem



Abb. 2 Tumorzellinjektion in das Caecum Injektion von 5×10^4 CT-26-Zellen subserös in die Darmwand des Caecums.

Wattestäbchen desinfiziert und die Peritonealhöhle mit einer Operationsschere durch eine mediane Laparotomie längs über etwa 1cm eröffnet. Das Caecum, das sich in der Maus in der Regel im linken Unterbauch befindet, wurde vorsichtig mittels eines Wattetupfers und einer Pinzette hervorluxiert und dargestellt. 5×10^4 CT-26-Zellen wurden nun in 10µl einer auf Eis gekühlten Suspension, bestehend aus gleichen Teilen PBS und Matrigel, mit Hilfe einer ebenfalls auf Eis gekühlten 27-Gauge-Hamilton®-Spritze (1702 N-PST 2, Hamilton Company, Reno, Nevada, USA) subserös in die Wand des Caecums in Richtung des Mesenterialansatzes, einen Zentimeter kaudal des ileocaecalen Übergangs, gespritzt (Abb.

2). Nach der Injektion wurde die Injektionsstelle zunächst mit einem Wattetupfer abgetupft und anschließend 20µl eines chirurgischen Sprühverbandes, Opsite-Spray (Smith&Nephew, Schwechat, Österreich), aufgebracht. Sowohl das Matrigel als auch die Versiegelung der Injektionsstelle mit Opsite-Spray dienten dazu, den Austritt von Tumorzellen und somit das Risiko für die Ausbildung einer operationsbedingten intraperitonealen Tumorzellverschleppung zu minimieren. Im nächsten Schritt wurde das Caecum wieder in die Peritonealhöhle zurückverlagert und der Bauchschnitt durch eine einschichtige, fortlaufende Naht (Catgut® Polyester weiß, 4/0 USP, Catgut GmbH, Markneukirchen, Deutschland) verschlossen. Zur Reduktion des postoperativen Schmerzes wurde den Tieren im Anschluss an die Operation Buprenorphinhydrochlorid in einer Dosis von 0,1mg/kg subkutan verabreicht.

Die Mäuse wachten in der Regel nach etwa 60min wieder aus der Narkose auf und liefen bereits 2h nach Beginn der Narkose wieder im Käfig herum.

Die Anzahl der Mäuse, die bei Anwendung dieser Methode Kolonkarzinome entwickelte, lag bei 70-80%. Dass nicht alle Tiere Tumoren ausbildeten, wurde auf eine fehlerhafte intramurale Tumorzellinjektion zurückgeführt. Tiere, die keine Tumoren entwickelten, wurden nicht in den Ergebnissen berücksichtigt.

2.5.2 MRT-Bildgebung im orthotopen Kolonkarzinommodell

14 Tage nach der Tumorzellinjektion in die Darmwand wurden die Tiere im Kleintier-MRT untersucht und die Tumoren mittels MRT volumetriert. Um einen sauberen Darm untersuchen zu können, wurde den Mäusen 12h vor Beginn der Untersuchung das Futter entzogen, bei weiterhin freiem Zugang zum Trinkwasser. Zum Transport der Tiere innerhalb des Biotechnikums vom Tierstall in das MRT wurden spezielle Transportboxen verwendet. Zur Vorbereitung der etwa 25-30min dauernden Untersuchung im Kleintier-MRT wurden die Tiere mit 1% - 1,5% Isofluran über ein spezielles Veterinärnarkosesystem narkotisiert, sowie gleichzeitig mit hochkonzentriertem Sauerstoff versorgt. Sobald die Tiere ausreichend tief narkotisiert waren, wurden sie in Bauchlage auf dem MRT-Schlitten platziert. Durch Einsatz eines Atemmonitors wurde die Atmung der Tiere während der Vorbereitung und der eigentlichen MRT-Untersuchung permanent überwacht und die Narkosetiefe über die



Abb. 3 7 Tesla-Kleintier-MRT Das Kleintier-MRT im Biotechnikum in dem die Untersuchungen durchgeführt wurden.

Atemfrequenz gesteuert. Zur Minimierung von Bewegungsartefakten wurde eine Atemfrequenz von 30-40/min angestrebt. Die Augen wurden durch einen Tropfen Bepanthen®-Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt.

Die Untersuchung selbst wurde in einem 7 Tesla MRT für Kleintiere (Abb. 3, Bruker, ClinScan, 7,0

Tesla, 290 mTesla/m Gradienten Stärke, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt. Die Bildgebung erfolgte in einer Ganzkörper-Maus-Spule (Bruker, Ettlingen, Germany), einer Volumen-Spule, die die Bildgebung einer ganzen Maus ohne Erzeugung von Inhomogenitäten erlaubt.

Zur Messung wurde zunächst eine hochauflösende, T2-gewichtete, koronare Sequenz durchgeführt (TR (repetition time = Zeit zwischen zwei Anregungsimpulsen): 1250 ms; TE (echo time = Zeit zwischen der Anregung und der Messung des Signals): 45 ms; FA (flip angle = Anregungswinkel): 180°; FoV (Field of view = Bildbereich): 40 mm × 40 mm; FoV Phase: 100%; Matrix (Bildzusammensetzung aus Pixeln): 240 × 320; 35 Schichten mit 0,7 mm Schichtdicke; Mittelungen: 1; keine Q-Fettsättigung; Aquisitionszeit: ca. 12min). In T2-gewichteten Sequenzen stellt sich Wasser hell, Fettgewebe hingegen eher dunkel dar. Im nächsten Schritt folgte eine weitere T2-gewichtete Sequenz in transversaler Ebene (TR: 1250 ms; TE: 41,0 ms; FA: 180°; FoV: 42 mm × 42 mm; FoV Phase: 100%; Matrix: 240 × 320; 24 Schichten mit 0,7 mm Schichtdicke; Mittelungen: 1; keine Q-Fettsättigung; Aquisitionszeit: ca. 15 min).

Im Anschluss an diese Untersuchung schloss sich noch die MRT-Untersuchung der Leber im Hinblick auf eine Lebermetastasierung an, die der Untersuchung im Lebermetastasenmodell glich und in Kapitel 2.6.2 ausführlich beschrieben wird.

Nach Beendigung der Untersuchung wurden die Tiere zunächst zur schnelleren Erholung in einen Einzelkäfig unter eine Rotlicht-Wärmelampe gelegt. Sobald sie wieder liefen, wurden sie in ihren ursprünglichen Käfig zu den anderen Tieren zurückgesetzt.

2.5.3 Versuchsablauf im orthotopen Kolonkarzinommodell

Zur Untersuchung des Einflusses von Makrophagen auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten wurde das oben beschriebene orthotope Kolonkarzinommodell verwendet und bei einer Gruppe von Balb/c-Mäusen die Makrophagen selektiv durch intraperitoneale Injektion von Clodronat-Liposomen depletiert. Weil erwartungsgemäß ein Teil der Tiere während des Versuchs an Infektionen verstarb bzw. keine Tumoren entwickelte, wurde in der Depletionsgruppe eine Gruppengröße von 20 Tieren gewählt. Als Kontrolle wurde in diesem Experiment einer Gruppe von 10 Tieren lediglich NaCl intraperitoneal injiziert.

Zunächst wurde den Tieren eine Woche gewährt, sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. An Tag 0 wurde dann die Injektion der CT-26-Tumorzellen in die Darmwand durchgeführt. Nachdem die Mäuse sich von dem Eingriff erholt hatten, wurde an Tag 2 mit der

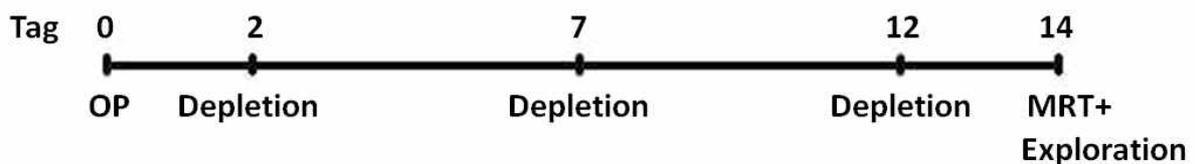


Abb. 4 Versuchsablauf im orthotopen Kolonkarzinommodell Übersicht über die zeitliche Abfolge von Tumorzellinjektion, Makrophagendepletion und abschließendem MRT. Tiere in der Kontrollgruppe erhielten zum Depletionszeitpunkt statt Clodronat-Liposomen eine intraperitoneale Injektion von NaCl.

Makrophagendepletion begonnen und wie in Kapitel 2.3 beschrieben durchgeführt. Die Clodronat-Injektionen wurden im Anschluss zweimal, nach jeweils 5 Tagen, mit der halben Ausgangsdosis wiederholt, um das Einwandern von neuen Makrophagen in die Tumoren und die Umgebung zu verhindern. Am 14. Tag erfolgte dann die Untersuchung der Tiere im 7 Tesla Kleintier-MRT, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, zur Tumorgößenbestimmung sowie zur Lebermetastasenevaluation (Abb. 4).

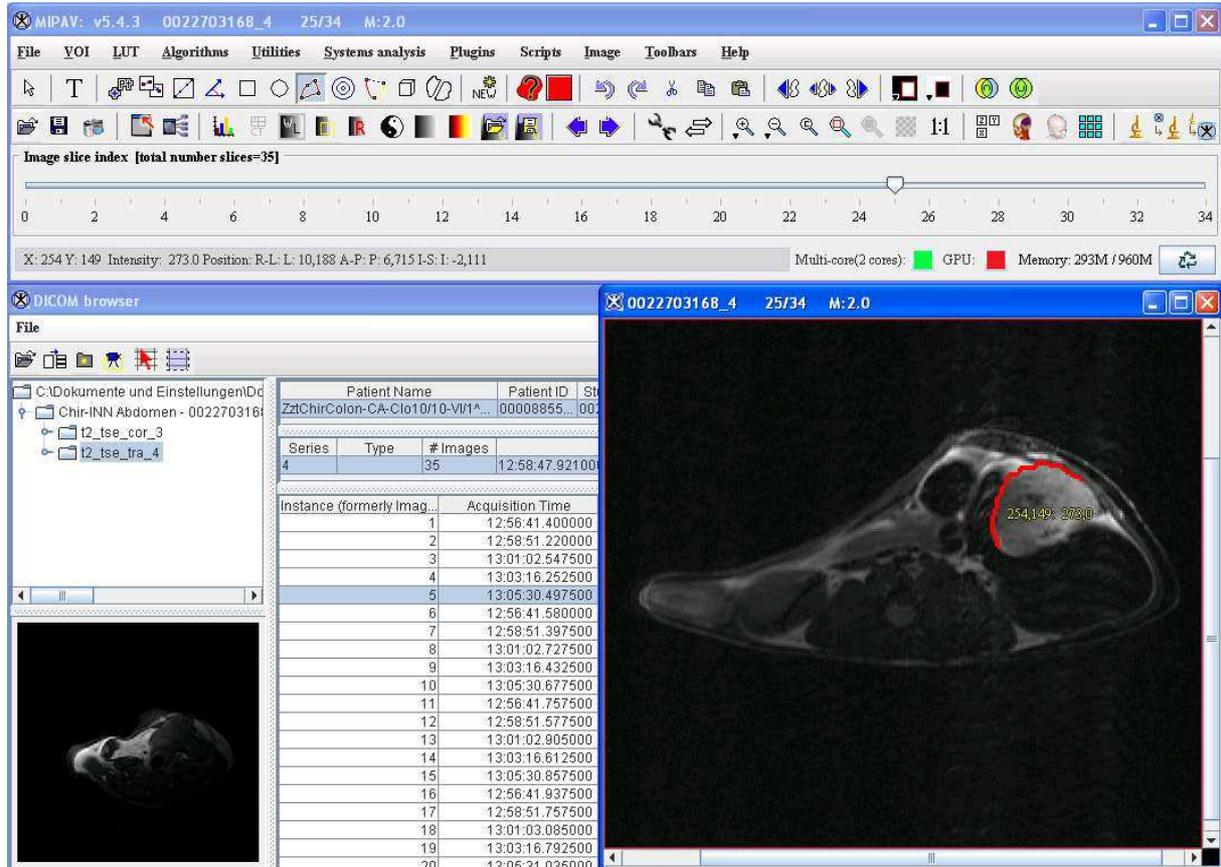


Abb. 5 Tumorvolumetrie mittels MIPAV Bestimmung des Tumolvolumens anhand der T2-gewichteten MRT-Sequenzen.

Das Volumen des Primärtumors sowie die Anzahl der Metastasen wurden mit Hilfe des Programmes MIPAV (medical imaging processing and visualization, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ausgewertet. Die Tumoren wurden hierzu mit sogenannten ROIs (Regions of interest) in allen Schichten sowohl in der koronaren als auch in der transversalen Ebene markiert und hieraus durch das Programm automatisch das Tumolvolumen bestimmt. Metastasen und sekundäre Tumoren ohne Kontakt zum Primärtumor wurden nicht in die Volumenberechnung mit einbezogen. Die Tumorränder konnten auch ohne Kontrastmittel vom umgebenden Gewebe sicher abgegrenzt werden (Abb. 5).

Im Anschluss an das MRT wurden die Tiere exploriert. Hierbei wurden die Mäuse zunächst mittels Ketanest S® in eine tiefe Narkose versetzt und daraufhin durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage fixiert, das Abdomen durch eine mediane Laparotomie eröffnet und im orthotopen Modell das Kolonkarzinom mit dem angrenzenden Darmabschnitt, die Leber sowie eventuelle peritoneale Absiedlungen

entfernt. Im Lebermetastasenmodell wurde lediglich die Leber entnommen. Der Situs wurde vor der Organentnahme sowie die Tumoren und betroffenen Organe zusätzlich einzeln nach der Exploration fotografisch dokumentiert. Nachdem die Primärtumoren von anhaftenden Darmabschnitten getrennt worden waren, wurde das Gewicht mittels Feinwaage bestimmt (Sartorius, Göttingen, Deutschland). Im nächsten Schritt wurden die Organe nun in 4,5% Formaldehyd (Universitätsapotheke, Greifswald, Deutschland) für mindestens 24h im Kühlschrank fixiert, anschließend bei Raumtemperatur in Ethanol entwässert und in Paraffin (Universitätsapotheke, Greifswald, Deutschland) eingebettet.

2.6 Lebermetastasenmodell

In einem zweiten Versuch wurde ein murines Lebermetastasenmodell herangezogen, um den Einfluss der lebereigenen Makrophagen im Hinblick auf das Metastasierungsverhalten zu untersuchen. Auch bei diesem Versuch wurden CT-26-Zellen verwendet, die diesmal in die Milz von Balb/c-Mäusen injiziert wurden mit der Absicht, die hämatogene Metastasierung über den Blutstrom der Pfortader zu simulieren.

2.6.1 Induktion von Lebermetastasen

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte wie im orthotopen Kolonkarzinommodell mit dem Unterschied, dass 5×10^5 CT-26-Zellen diesmal nur in 250µl PBS statt in PBS und Matrigel resuspendiert wurden. Durch Injektion von 25µl dieser Suspension erhielt jede Maus hierbei somit ebenfalls 5×10^4 Zellen.

Die Anästhesie der Tiere wurde, wie für das orthotope Kolonkarzinommodell beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde das Fell der Mäuse mit 70%-Ethanol desinfiziert und die Peritonealhöhle durch eine linksseitige, quere Oberbauchlaparotomie über knapp 1cm unterhalb des Rippenbogens eröffnet. Die Milz wurde mit einem sterilen Wattestäbchen sowie einer Pinzette hervorluxiert und die vorbereitete Suspension von 5×10^4 CT-26 Zellen in einem definierten Volumen von 25µl PBS mit einer 27-Gauge-Hamilton®-Spritze langsam unter die Milzkapsel gespritzt (Abb. 6). Um Nachblutungen und den Austritt von Zellen in die Peritonealhöhle zu verhindern, wurde die Injektionsstelle im Anschluss mit einem

Wattestäbchen

komprimiert, bis die Blutung gestoppt war. Abschließend wurde die Milz wieder in die Peritonealhöhle verlagert und der Bauchschnitt durch eine einschichtige, fortlaufende Naht verschlossen sowie die Schmerzbehandlung, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben,

durchgeführt. Auch hier wachten die Tiere etwa 60min nach Beginn der Narkose wieder auf und liefen weitere 60min später bereits wieder durch den Käfig.

Der Anteil der Tiere, der durch diese Methode zwei Wochen nach Tumorzellinjektion in die Milz Lebermetastasen aufwies, lag bei 100%.



Abb. 6 Milzinjektion Subkapsuläre Injektion von 50.000 CT-26-Zellen in die Milz.

2.6.2 MRT-Bildgebung im Lebermetastasenmodell

Zur Bestimmung der Lebermetastasenanzahl im einzelnen Tier wurden die Mäuse 14 Tage nach der Tumorzellinjektion in die Milz im Kleintier-MRT untersucht (Abb. 7). Den Tieren musste vor der Untersuchung in diesem Versuchsmodell nicht das Futter entzogen werden. Unmittelbar vor Beginn der Untersuchung wurde jeder Maus nach Einleitung der Isofluran-Narkose 120µl des leberspezifischen MRT-Kontrastmittels Primovist® (Gadolinium-Chelat, Bayer Schering Pharma, Berlin), verdünnt mit NaCl, in einer Konzentration von 0,025mmol/ml intravenös in die Schwanzvene injiziert. Durch die Verwendung eines Atemmonitors wurde die Atmung der Mäuse vor und während der Messung im MRT überwacht und die Narkosetiefe über die Atemfrequenz gesteuert. Bei der Untersuchung wurde eine Atemfrequenz von 30-40/min angestrebt. Die Tiere wurden in Bauchlage in der Ganzkörper-Maus-Spule mit Hilfe einer sogenannten flash3d-vibe-Sequenz („volumetric

interpolated breathhold examination“) untersucht. Hierbei handelt es sich um eine T1-gewichtete, dreidimensionale Gradienten-Echo-Sequenz, die eine hohe Ortsauflösung bei gleichzeitig kurzer Untersuchungsdauer ermöglicht. Bilder wurden sowohl in der transversalen als auch in der koronaren Ebene generiert (transversale und koronare Ebene: TR: ca. 10 ms; TE: 1,46 ms; FA: 12°; FoV: 50 mm × 50 mm; Matrix: 256 × 256; 48 Schichten mit 0,3 mm Schichtdicke; Aquisitionszeit: ca. 2:45 min pro Ebene). Hierauf folgend wurden ebenfalls noch T2-gewichtete Bilder in der transversalen Ebene (TR: 1250 ms; TE: 41,0 ms; FA: 180°; FoV: 45 mm × 45 mm; FoV Phase: 100%; Matrix: 240 × 320; 24 Schichten mit 0,7 mm Schichtdicke; Mittelungen: 1; keine Q-Fettsättigung; Aquisitionszeit: ca. 15 min), wie bereits oben beschrieben, erzeugt.

2.6.3 Versuchsablauf im Lebermetastasenmodell

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Kupffer-Zellen auf die Entwicklung von Lebermetastasen beim Kolonkarzinom in der Maus zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde in einem zweiten Tierversuch das oben beschriebene Lebermetastasenmodell verwendet und in diesem die Kupffer-Zellen selektiv durch Gabe von Clodronat-Liposomen depletiert. Weil auch bei diesem Experiment zu erwarten war, dass ein Teil der Versuchstiere an Infektionen aufgrund der Makrophagendepletion verenden würde, bestand die Depletionsgruppe aus 15 Tieren. Aus Gründen, die bereits in Kapitel 2.3 geschildert wurden, waren in diesem Lebermetastasenmodell zwei Kontrollgruppen gewählt worden, die entweder PBS-Liposomen (8 Tiere) oder NaCl (7 Tiere) intraperitoneal injiziert bekamen. Damit die Kupffer-Zellen zum Zeitpunkt der Tumorzellinjektion bereits vollständig depletiert waren, wurden die Clodronat-Liposomen, PBS-Liposomen bzw. NaCl in den jeweiligen

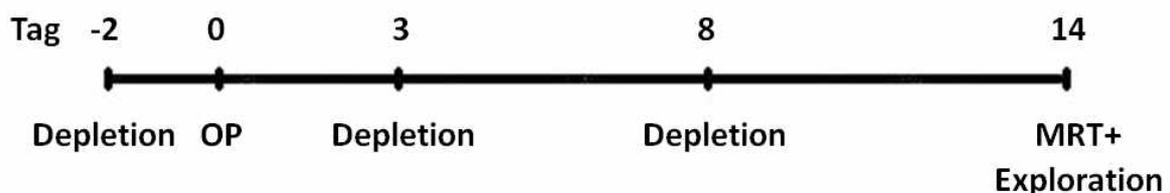


Abb. 7 Versuchsablauf im Lebermetastasenmodell Übersicht über die zeitliche Abfolge von Tumorzellinjektion in die Milz, Kupffer-Zelldepletion und MRT der Leber. Zum Zeitpunkt der Depletion erhielten die Tiere in den Kontrollgruppen PBS-Liposomen bzw. NaCl.

Tiergruppen bereits zwei Tage vorher verabreicht. Um das neuerliche Einwandern von Makrophagen zu verhindern, wurde die Depletion zweimal, nach jeweils fünf Tagen, mit der halben Dosis wiederholt. 14 Tage nach der Tumorzellinjektion in die Milz wurden die Mäuse dann zunächst im MRT nach oben beschriebenen Protokoll untersucht und im Anschluss daran exploriert (Abb. 7).

Die Auswertung der Metastasenanzahl im einzelnen Tier erfolgte mit Hilfe von MIPAV. Weil die Lebermetastasen im MRT erst ab einer Größe von 1-2mm erkennbar waren, wurde zur Bestimmung der Gesamtmetastasenzahl in der Leber das folgende Verfahren gewählt: Die bei der Exploration an der Leberoberfläche makroskopisch sichtbaren Metastasen wurden zu den im MRT ermittelten Metastasen, die nicht die Leberkapsel erreichten, addiert.

Bei der Exploration der Tiere wurde, wie beim orthotopen Kolonkarzinom beschrieben, vorgegangen. Die Tiere wurden nach ausreichender Narkose durch zervikale Dislokation getötet, die Peritonealhöhle eröffnet und die Leber entnommen. Die auf der Leberoberfläche sichtbaren Metastasen wurden gezählt und abschließend das Organ mittels Feinwaage gewogen. Auch hier wurden sämtliche Befunde fotografisch dokumentiert und die Organe in Paraffin eingebettet.

2.7 HE-Färbung

Zur histologischen Untersuchung wurden aus den hierfür gefrorenen Paraffinblöcken mithilfe des Mikrotoms (Leica, Wetzlar, Deutschland) 4µm dicke, repräsentative Schnitte angefertigt, im Wasserbad (HI 1210, Leica, Wetzlar, Deutschland) bei 37°C gestreckt, auf Objektträger (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) gezogen und über Nacht getrocknet.

Die HE-Färbung ist eine gebräuchliche Übersichtsfärbung. Der Farbstoff Hämatoxylin ist ein positiv geladener Farbstoff, der negativ geladene (basophile) Strukturen, wie z.B. die DNA des Zellkerns, blau färbt. Eosin ist hingegen ein negativ geladener Farbstoff, der zur Gegenfärbung dient und positiv-geladene, azidophile Strukturen, rötlich anfärbt. Bevor die histologischen Schnitte gefärbt wurden, wurden sie zunächst für 20min in Xylol (J. T. Baker, Deventer, Niederlande) sowie danach in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils eine Minute in 100%, 95% und 70% Ethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert und im

Anschluss für 5min in PBS rehydriert. Zur Färbung wurden die Schnitte dann 30-60 Sekunden in Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelagert und anschließend für 2-3min unter fließendem Wasser gespült. Im nächsten Schritt erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) für etwa 30 Sekunden, welches zuvor mit Aqua dest. 1:10 verdünnt worden war. Im Folgenden durchliefen die Schnitte noch eine aufsteigende Alkoholreihe mit 95% und 100% Ethanol für jeweils 30 Sekunden, bevor sie abschließend 2-3min in einem Xylol-Bad gelagert wurden. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie mittels eines Tropfens Vectamount (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) sowie Deckgläschen (24x24mm, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) eingedeckelt.

Zur Auswertung der Tumormorphologie sowie der Lokalisation und Größe der Lebermetastasen wurden die Schnitte nun mit Hilfe eines Lichtmikroskops (BZ-9000, Keyence Corporation, Osaka, Japan) begutachtet. Im Lebermetastasenmodell wurde die Metastasenlokalisierung in Bezug zur Leberoberfläche ausgewertet, indem der Abstand von der Leberoberfläche zum Zentrum der Metastasen mittels der Auswertungssoftware von Keyence ausgemessen wurde.

2.8 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, bei dem ein verwendeter primärer Antikörper an ein bestimmtes gesuchtes Zielepitop im Gewebe bindet und ein sekundärer Antikörper, an den ein Enzym gekoppelt ist, wiederum an den primären Antikörper bindet. Durch die nun folgende Zugabe eines bestimmten Substrates, das von dem gekoppelten Enzym umgesetzt wird, kommt es zu einer lokalen Anfärbung des Gewebes (indirekte Methode).

2.8.1 F4/80-Färbung

Zur Bestimmung der Makrophagendichte in den orthotopen Kolonkarzinomen bzw. der Kupffer-Zelldichte in der Leber wurde eine F4/80-Immunhistochemie angefertigt. F4/80 ist ein Membranprotein auf der Oberfläche von Makrophagen und Monozyten und eignet sich zur spezifischen Anfärbung derselben.

Das Einbetten in Paraffin sowie das Anfertigen der Schnitte wurde, wie bereits oben beschrieben, durchgeführt. Die Färbung begann auch hier mit der Entparaffinierung, allerdings hier zunächst nur für 10min in Xylol. Hieran schlossen sich weitere Bäder für 5min in Methanol, 10min in Xylol, 5min in Methanol und abermals 10min in Xylol an. Im Anschluss daran durchliefen die Schnitte eine absteigende Alkoholreihe für jeweils 10min in 100%, 95%, sowie 70% Ethanol. Hierauf folgte die Rehydrierung für 5min im PBS-Bad, sowie die Antigen-Demaskierung, die mit der DAKO Retrieval Solution (DAKO Target Retrieval Solution S1700, DAKO Deutschland, Hamburg) bei 100°C und einem pH von 6,0 für 45min in einem Dampfdrucktopf durchgeführt wurde. Im Anschluss daran wurden die Schnitte im Wasserbad für 15min abgekühlt und mit einem Fettstift auf den Objektträgern umrandet. Um die Schnitte vor dem Austrocknen zu schützen, wurden alle weiteren Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt, beginnend mit zweimaligem Waschen in PBS für jeweils 5min. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde nun mittels 3%igem, in Aqua dest. verdünntem H₂O₂, für 20min blockiert. Im Anschluss daran wurden die Schnitte dreimal für 5min in PBS gewaschen und für eine Stunde mit 1:10 mit PBS verdünntem Aureon-BSA (Aurion-BSA-c™, Aurion, Binnenhaven, Niederlande) versetzt. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem 1:50 verdünnten primären Ratte-anti-Maus F4/80-Antikörper (MCA 497R, Serotec, Raleigh, NC, USA) in 10% Aurion-BSA über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag folgten nun wiederum bei Raumtemperatur zunächst drei Waschschrte für jeweils 5min in PBS und anschließend die Inkubation der Schnitte für eine Stunde mit dem sekundären, mit Peroxidase konjugiertem, Ziege-anti-Ratte IgG-Antikörper (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA), welcher 1:200 in 10% Aurion-BSA verdünnt wurde. Hierauf folgten drei weitere fünfminütige Waschschrte in PBS sowie die Aufbringung des Substrates 3,30'-Diaminobenzidin durch den Peroxidase-Substrate DAB-Kit (SK4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 25min. Abschließend wurden die Schnitte ein weiteres Mal für 5min mit PBS versetzt, dann für 20-30 Sekunden in Hämatoxylin gefärbt und anschließend unter fließendem Wasser für 2-3min gewaschen. Hierauf folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils einminütigem Bad in 70%, 95% und 100% Ethanol, sowie eine weitere Minute in Xylol. Nachdem die histologischen Schnitte nun getrocknet waren, erfolgte die Eindeckelung wie bereits oben beschrieben.

Leberschnitte wurden jeweils als Positivkontrollen verwendet. Negativ-Kontrollen wurden durch Weglassen des Primärantikörpers angefertigt.

Die Auswertung der F4/80-Immunhistochemie der orthotopen Kolonkarzinome erfolgte zunächst durch Aufnahme von zehn Bildern aus dem Tumor bei 200x Vergrößerung an zufällig gewählten Punkten auf dem Gewebeschnitt. Mit Hilfe der Auswertungssoftware ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) wurde nun die Makrophagendichte durch Bestimmung der prozentual positiv-gefärbten Fläche ermittelt. Hierbei wurden alle Schnitte unter den gleichen Einstellungen ausgewertet und anschließend ein Mittelwert aus den zehn ausgewerteten Bildern einer jeden Maus gebildet. Die Bestimmung der Kupffer-Zelldichte im Leberparenchym wurde analog durchgeführt (Abb. 8).

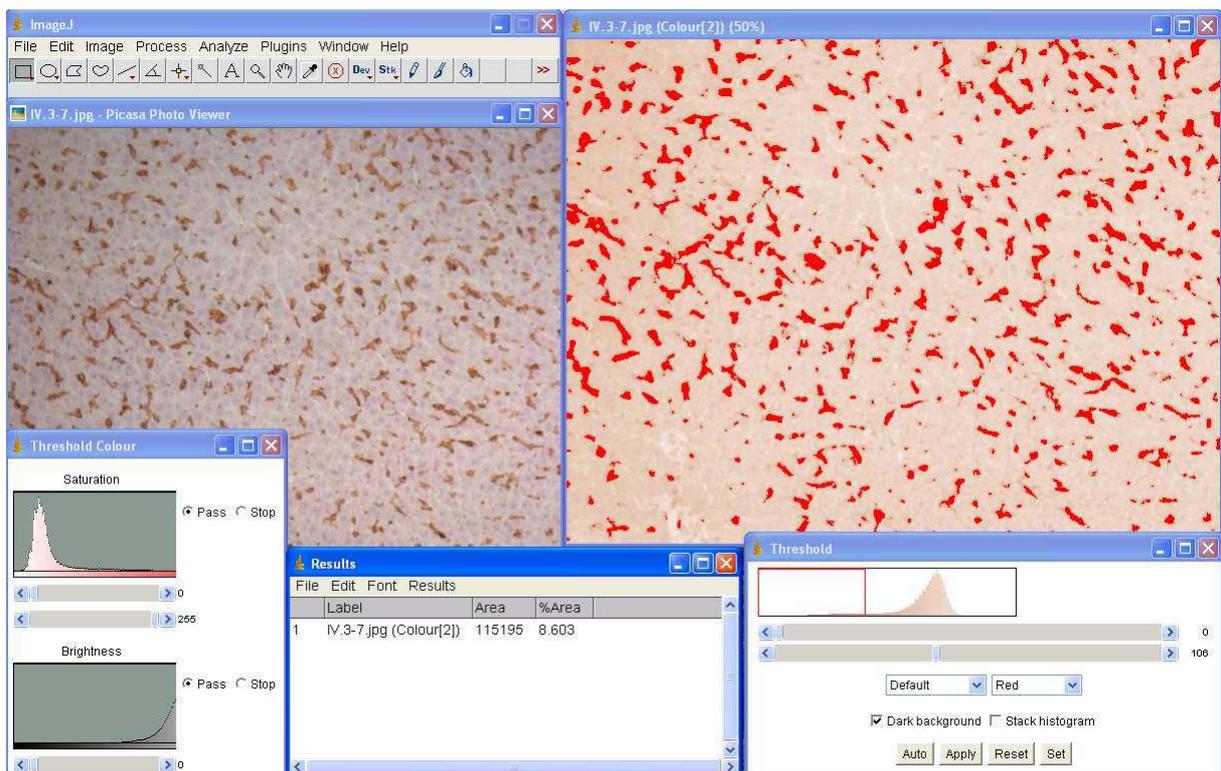


Abb. 8 Auswertung der Makrophagendichte mittels ImageJ Berechnung der Makrophagendichte anhand der prozentual braun gefärbten Fläche, hier beispielhaft anhand eines Ausschnittes aus dem Leberparenchym.

2.8.2 CD31-Färbung

Zur Beurteilung der Gefäßdichte in den orthotopen Kolonkarzinomen wurde eine CD31-Immunhistochemie durchgeführt. CD31 ist ein membranständiges Glykoprotein, das als Adhäsionsmolekül in hoher Dichte auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte wie bereits oben beschrieben. Die Entparaffinierung wurde, anders als bei der F4/80-Färbung, zunächst für 20min in Xylol und anschließend für jeweils 10min in 100%, 95%, sowie 70% Ethanol durchgeführt. Hierauf folgte die Rehydrierung für 5min im PBS-Bad. Die Antigen-Demaskierung wurde in diesem Fall nur für 10min bei 100°C mit der DAKO Retrieval Solution in einem Dampfdrucktopf ausgeführt. Ansonsten wurden die ersten Schritte analog zur oben beschriebenen F4/80-Färbung absolviert. Als Primärantikörper wurde ein Kaninchen-anti-Maus PECAM-1-Antikörper (sc-1506, Santa Cruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, CA, USA) in einer Konzentration von 1:100 in 10% Aurion-BSA für 2h aufgebracht. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5min in PBS wurde als Sekundärantikörper 1:200 verdünntes Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (NA934V, GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) in 10% Aurion-BSA verwendet. Die abschließenden Schritte einschließlich der Substratanwendung wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Die Gefäßdichte in den orthotopen Tumoren wurde ermittelt, indem auf zehn zufällig ausgewählten Bildern pro Tumor bei 200x Vergrößerung die Anzahl der Gefäße pro Gesichtsfeld bestimmt und anschließend ein Mittelwert für jedes Tier gebildet wurde.

2.9 Weitere Untersuchungen zur Verbesserung der Bildgebung des Darmes der Maus im MRT

Die vollständige Darstellung des Dickdarmes der Maus war bisher nur mit nicht befriedigenden Ergebnissen möglich. Ein zusätzliches Ziel im Rahmen dieser Arbeit war es daher, eine Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe die MRT-Bildgebung des Dickdarmes der Maus verbessert werden konnte. Durch Modifikationen bei der Darmvorbereitung der Tiere und der Kontrastierung der Dickdärme, konnten zwei neue Methoden zur MRT-Darstellung des Kolons der Maus entwickelt werden, die dann standardmäßig eingesetzt wurden. Die

Vorbereitung der Tiere, die Darmkontrastierung und die MRT-Untersuchungseinstellungen werden nachfolgend beschrieben.

2.9.1 MRT-Bildgebung mit Kontrastierung des Darmlumens

In der zunächst entwickelten ersten Methode zur verbesserten Kolon-Bildgebung wurde das Darmlumen durch die transrektale Applikation von Kontrastmittel dargestellt. Um zum Untersuchungszeitpunkt einen sauberen, entleerten Darm zu erhalten, wurde den Tieren 18h vor Beginn der Messungen im MRT das Trockenfutter entzogen und das Trinkwasser durch eine Mischung, bestehend zu 2/5 aus dem osmotischen Abführmittel Sorbitol (Sorbitol – Trinklösung 40%, Universitätsapotheke Greifswald) und 3/5 aus angesäuertem Leitungswasser ersetzt. Zur Untersuchungsvorbereitung wurden die Mäuse durch eine Isofluran (1% - 1,5%)-Gasnarkose, wie bereits oben beschrieben, anästhesiert. Die Atmung der Tiere wurde während der Vorbereitung und der eigentlichen MRT-Untersuchung permanent überwacht und die Narkosetiefe über die Atemfrequenz gesteuert. Sobald die Tiere ausreichend tief narkotisiert waren, wurden sie in Bauchlage auf dem MRT-Schlitten platziert und die Isofluran-Narkose über ein Veterinärnarkosesystem unter gleichzeitiger Zugabe von Sauerstoff (1l/min) aufrechterhalten. Ein noch ungeblockter Angiographie-Katheter (PowerFlex® P3 PTA Dilation Catheter C-1725, 5,0mm x 2cm, 135cm, Johnson & Johnson Health Care Systems Inc., Picataway, NJ, USA) wurde nun vorsichtig etwa 1-2cm in das Rektum unter Verwendung von Bepanthen®-Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) vorgeschoben. Der Ballon des Katheters wurde vorsichtig durch Insufflation von Luft geblockt, sodass Flüssigkeit nicht retrograd aus dem Rektum herausfließen konnte. Im nächsten Schritt wurden etwa 2ml einer auf 37°C angewärmten Lösung bestehend aus NaCl sowie 1:200 verdünntem Omniscan™ (Gadodiamid, 0,5mmol/ml, GE Healthcare Buchler GmbH&Co. KG, Braunschweig) und 300µl/10ml Butylscopolamin (Rotexmedica, Trittau) langsam, unterbrochen von mehreren Pausen, über den Katheter in das Rektum injiziert. Abschließend wurde die Maus durch einen Streifen Leukosilk®-Klebeband (BSN medical, Hannover, Deutschland), quer über den Rücken geklebt, auf dem MRT-Schlitten fixiert (Abb. 9). Im Anschluss wurden die Mäuse im 7 Tesla-MRT für Kleintiere unter Verwendung einer Ganzkörper-Maus-Spule untersucht (Abb. 9).

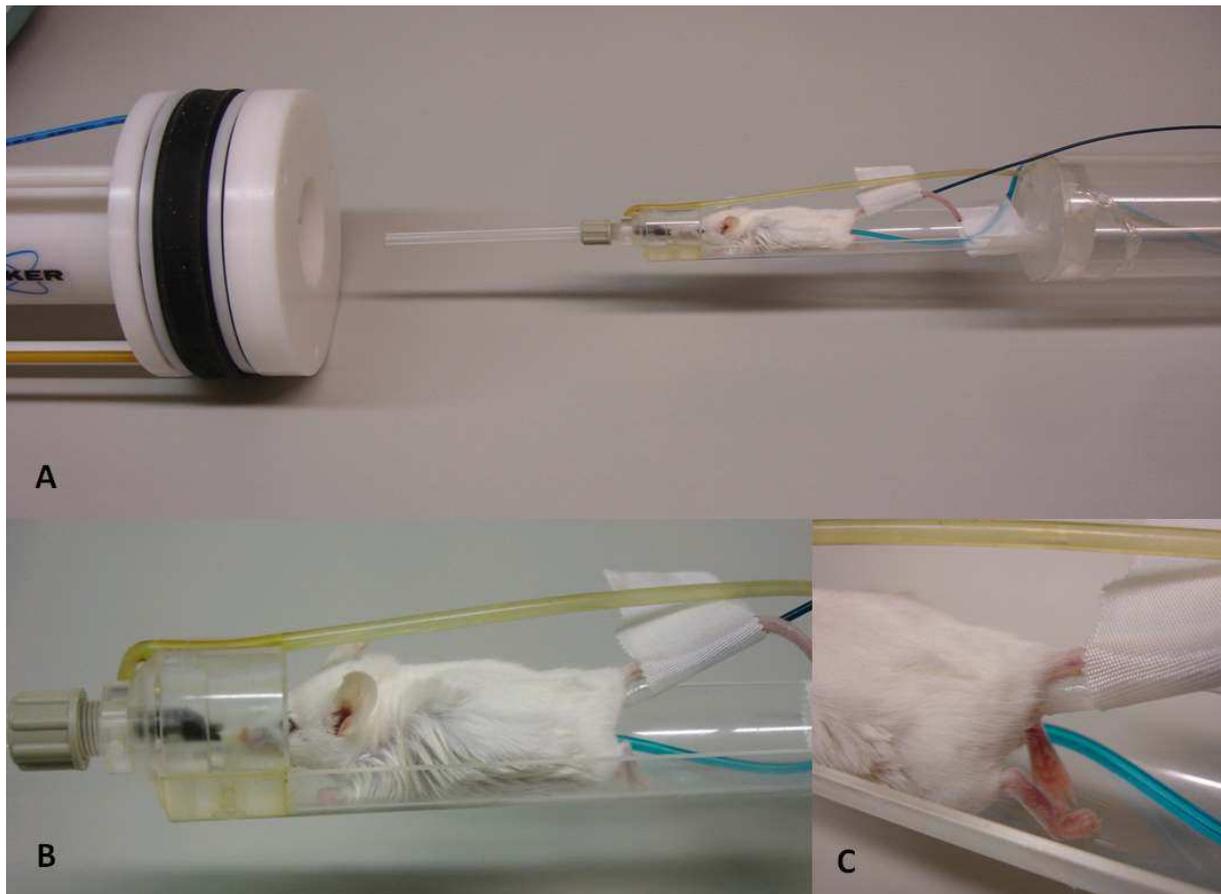


Abb. 9 MRT-Aufbau zur Darmuntersuchung (A) Maus auf dem MRT-Schlitten kurz vor Beginn der Untersuchung im 7-Tesla-Kleintier-MRT mit Hilfe der Ganzkörper-Spule (links). (B) Die Isofluran-Narkose (gelber durchsichtiger Schlauch) wird über die Atemfrequenz (türkiser Schlauch mit Atemmonitor verbunden) gesteuert. Mit Kontrastmittel versetzte Kochsalzlösung wird über den Angiographiekatheter (schwarz) in den Darm gegeben. (C) Der weißlich-durchsichtige Ballon ist, im Rektum liegend, sichtbar.

Zur Darstellung des Darmes wurde eine hoch auflösende T1-gewichtete Vibe („volumetric interpolated breathhold examination“) in der frontalen und auch in der horizontalen Ebene durchgeführt (T1 Flash 3D-Vibe: Frontal-Ebene: TR (repetition time): 11,0 ms; TE (echo time): 1,48 ms; FA (flip angle): 14°; FoV (field of view): 54 mm × 54 mm; FoV Phase: 78,1%; Matrix: 256 × 256; 52 Schichten mit 0,5 mm Schichtdicke; Mittelungen: 2; Q-Fettsättigung; Aquisitionszeit: ca. 3,5 min; Horizontal-Ebene: TR: 10 ms; TE: 1,84 ms; FA: 14°; FoV: 40 mm × 40 mm; FoV Phase: 100%; Matrix: 256 × 256; 96 Schichten mit 0,5 mm Schichtdicke; Mittelungen: 2; Q-Fettsättigung; Aquisitionszeit: ca. 7,5 min). Die 3D-Rekonstruktion der MRT-Bilder erfolgte mittels der Software syngo fastView (Siemens, Erlangen).

Nach der Untersuchung wurden die Tiere zur schnelleren Erholung zunächst in einem Einzelkäfig unter eine Rotlicht-Wärmelampe gelegt. Ein Großteil der mit Kontrastmittel und

Buscopan versetzten Kochsalzlösung floss unmittelbar nach Entfernen des Katheters aus dem Rektum bis zum Aufwachen der Mäuse bereits wieder ab. Sobald die Mäuse wieder durch den Käfig liefen, wurden sie in ihren ursprünglichen Käfig zurückgesetzt und bekamen nun wieder Futter und Wasser ad libitum.

2.9.2 MRT-Bildgebung mit Kontrastierung der Darmwand

In einer darüber hinaus entwickelten zweiten Methode erfolgte die Kontrastmittelapplikation intravenös zur Kontrastierung der Darmwand. Hierbei wurde die Darmvorbereitung und Anästhesie der Tiere wie oben beschrieben durchgeführt. Sobald die Tiere ausreichend narkotisiert waren, erfolgte die intravenöse Applikation von 120µl des Kontrastmittels Gadovist® (Gadobutrol, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) in einer Konzentration von 0,0133mmol/ml. Im Anschluss hieran wurden die Tiere in Bauchlage auf dem MRT-Schlitten platziert und die Isofluran-Narkose wie oben beschrieben aufrechterhalten. Auch hier wurde den Tieren der Angiographie-Katheter in das Rektum eingeführt, jedoch diesmal 2ml NaCl-Lösung lediglich mit 300µl/10ml Butylscopolamin versetzt in das Kolon injiziert.

Nun wurden die Mäuse mittels einer hoch auflösenden T1-gewichteten Flash3d-Vibe-Sequenz in der frontalen und auch in der horizontalen Ebene untersucht (T1 Flash 3D-Vibe: Frontal-Ebene: TR: 10,0 ms; TE: 1,84 ms; FA: 14°; FoV: 40 mm × 40 mm; FoV Phase: 100%; Matrix: 256 × 256; 96 Schichten mit 0,5 mm Schichtdicke; Mittelungen: 2; Q-Fettsättigung; Aquisitionszeit: ca. 7,5 min; Horizontal-Ebene: TR: 11 ms; TE: 1,84 ms; FA: 14°; FoV: 54 mm × 42 mm; FoV Phase: 78%; Matrix: 256 × 256; 52 Schichten mit 0,5 mm Schichtdicke; Mittelungen: 2; Q-Fettsättigung; Aquisitionszeit: ca. 3,5 min).

2.10 Statistik

Statistische Analysen der *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse wurden mittels des Programms GraphPad Prism Version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. In den Fällen, in denen eine ausreichende Gruppengröße und eine statistische Normalverteilung vorlag, wurden Gruppen mit Hilfe des Students-t-Tests verglichen. In

solchen Fällen, in denen keine Gauss'sche Normalverteilung gegeben war, wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Der Vergleich dreier Gruppen wurde mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Mann-Whitney-Test zum Vergleich zwischen jeweils zwei Gruppen, durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardfehler (SEM) angegeben. Für Korrelationen wurde der Spearman-Test angewendet. Unterschiede wurden als statistisch signifikant angesehen bei Werten von $p < 0,05^*$ und $p < 0,01^{**}$.

3 Ergebnisse

3.1 Zytotoxizitäts-Assay

Das Inkubieren der CT-26-Kolonkarzinomzellen mit verschiedenen Konzentrationen von Clodronat-Liposomen für 24h zeigte wiederholt keinen Effekt auf die Proliferation der Tumorzellen, verglichen mit den Zellen, die zur Kontrolle lediglich DMEM-Medium ausgesetzt waren. Absorptions-Messungen zeigten Mittelwerte von 4355 +/- 202,7 (DMEM), 4381 +/- 252,4 (DMEM + 1:100 Clodronat-Liposomen) und 4344 +/- 178,5 (DMEM + 1:200 Clodronat-Liposomen)(Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,9976$; Abb. 10).

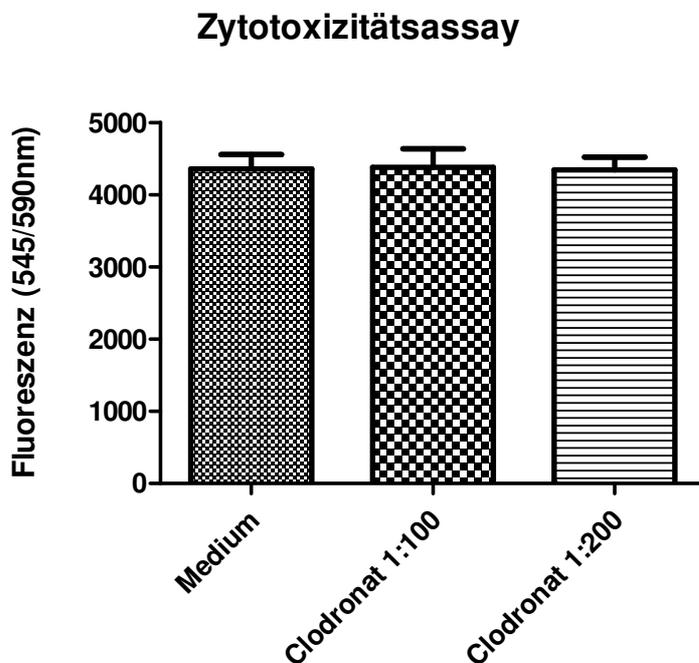


Abb. 10 Zytotoxizitätsassay
Inkubation von 2.500 CT-26-Zellen/Loch über 24h mit reinem DMEM bzw. 1:100 und 1:200 mit Clodronat-Liposomen versetztem DMEM und anschließende Bestimmung der Zellvitalität (Exzitation 545nm, Emission 590nm, $p=0,9976$).

3.2 Orthotopes Kolonkarzinommodell

Zum Zeitpunkt der Beendigung des Versuches, 14 Tage nach der Tumorzellinjektion in das Caecum der Tiere, lebten in der Makrophagen-depletierten Gruppe noch 7 von 20 Tieren, von denen 6 ein Kolonkarzinom ausgebildet hatten. In der Kontrollgruppe, die lediglich NaCl erhalten hatte, lebten noch alle 10 Mäuse, wobei 6 hiervon Kolonkarzinome aufwiesen. Die

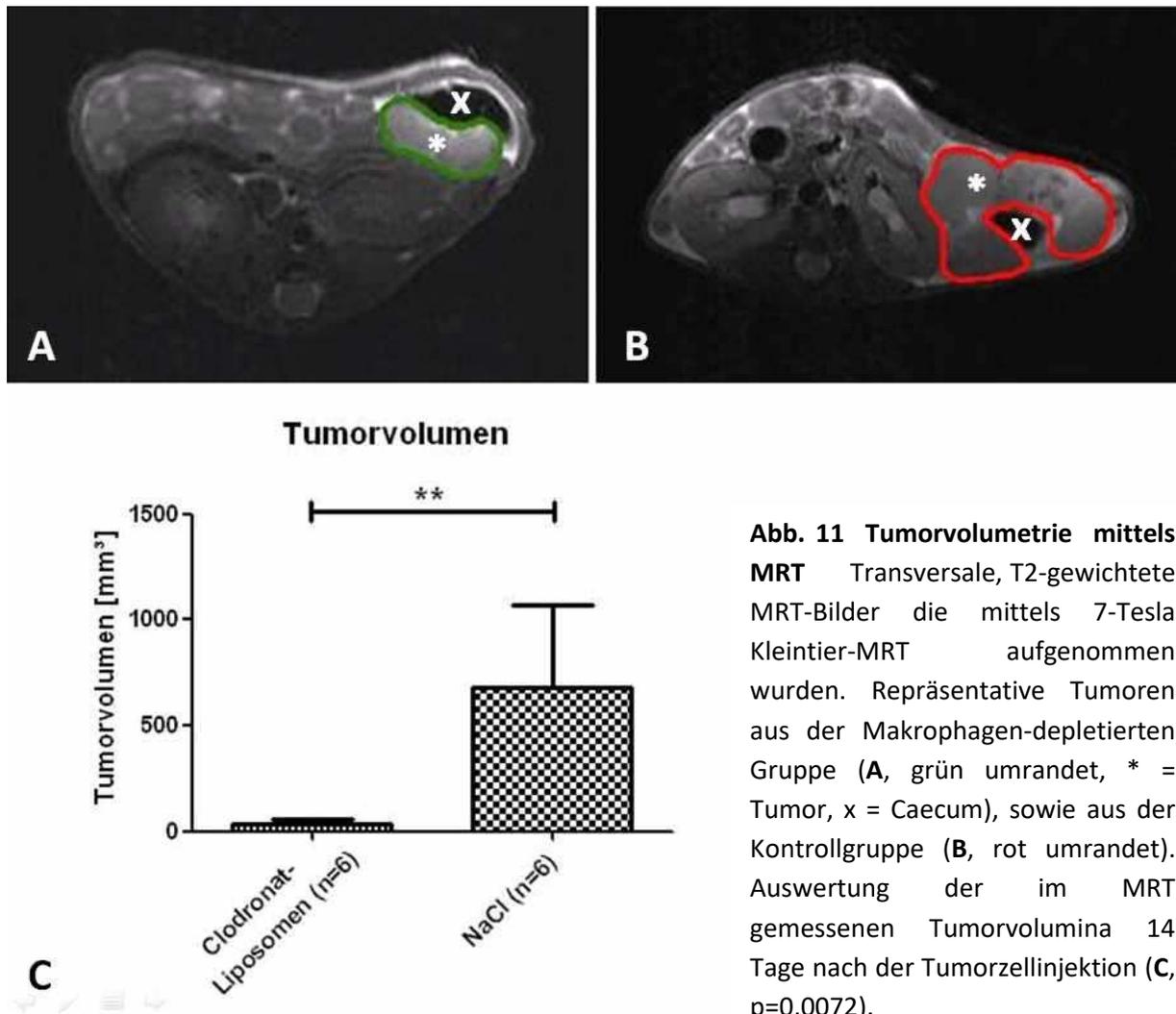
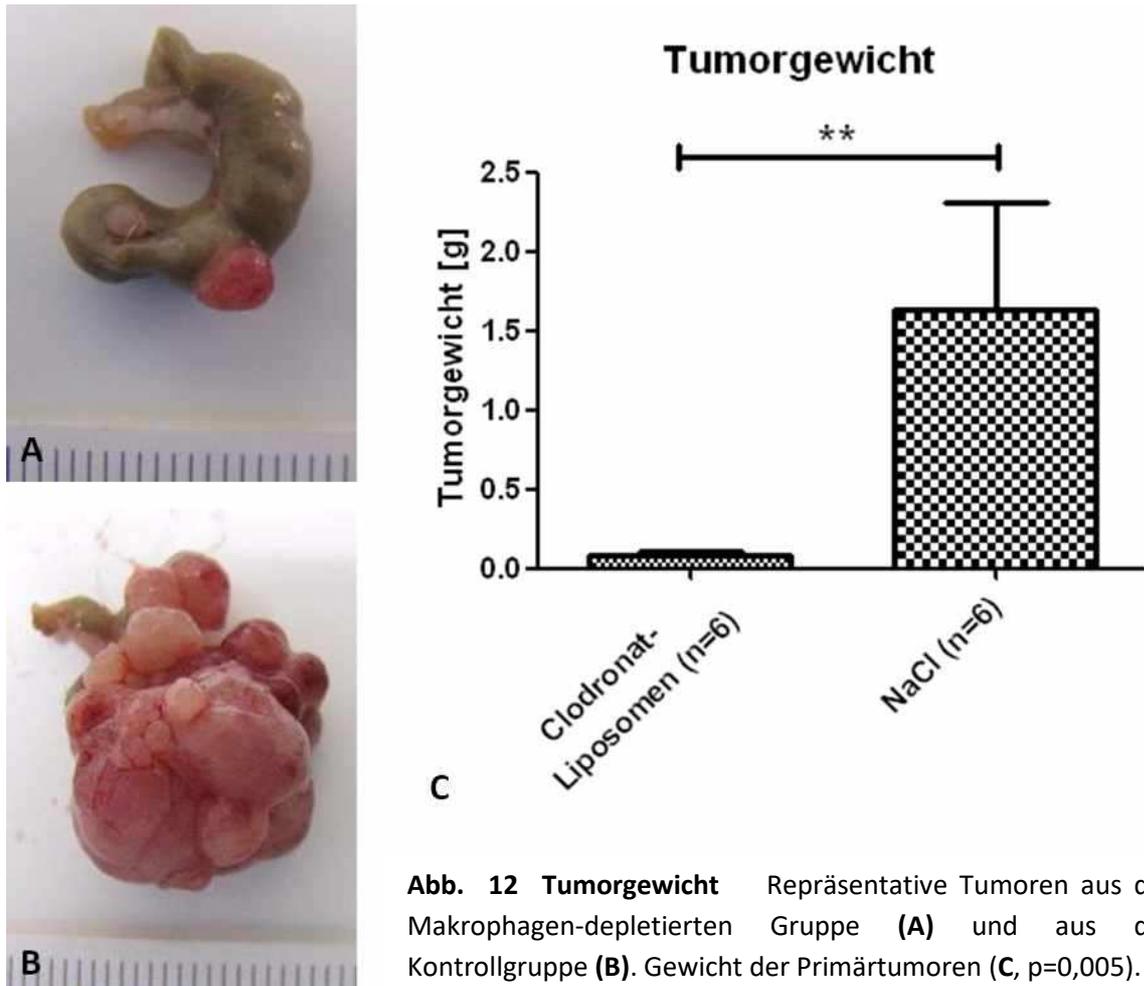


Abb. 11 Tumorvolumetrie mittels MRT Transversale, T2-gewichtete MRT-Bilder die mittels 7-Tesla Kleintier-MRT aufgenommen wurden. Repräsentative Tumoren aus der Makrophagen-depletierten Gruppe (A, grün umrandet, * = Tumor, x = Caecum), sowie aus der Kontrollgruppe (B, rot umrandet). Auswertung der im MRT gemessenen Tumorvolumina 14 Tage nach der Tumorzellinjektion (C, p=0,0072).

Auswertung des Tumorvolumens anhand der MRT-Bilder mittels MIPAV ergab, dass die Mäuse in der Gruppe, die mit Clodronat-Liposomen (n = 6) behandelt worden war, signifikant kleinere Tumoren aufwiesen mit einem mittleren Tumorvolumen von $37\text{mm}^3 \pm 20\text{mm}^3$, im Vergleich zu den Tieren, die NaCl (n = 6) erhalten hatten, mit einem mittleren Tumorvolumen von $683\text{mm}^3 \pm 389\text{mm}^3$ (p = 0,0072; Abb. 11).

Das Ergebnis konnte noch einmal bestätigt werden, als die Tiere im Anschluss an das MRT exploriert und die Tumoren mittels Feinwaage gewogen wurden. Tumoren in der Makrophagen-depletierten Gruppe waren signifikant leichter mit einem Mittelwert von $0,084\text{g} \pm 0,027\text{g}$, verglichen mit dem Tumorgewicht in der Kontrollgruppe mit einem



Mittelwert von 1,633g +/- 0,672g ($p = 0,005$; Abb. 12). Es fiel auf, dass keine Maus in der Makrophagen-depletierten Gruppe ($n = 6$) Lebermetastasen oder eine Peritonealkarzinose aufwies. In der Kontrollgruppe hingegen zeigten 4 von 6 Mäusen Lebermetastasen (Spannweite 2 bis 5 Metastasen pro Maus) und 5 von 6 Tieren wiesen eine ausgeprägte Peritonealkarzinose auf (Abb. 13, Tab. 1).

	Clodronat-Liposomen	NaCl
Anzahl der Tiere	6	6
Tumorzvolumen	37mm ³ +/- 20mm ³	683mm ³ +/- 389mm ³
Tumorgewicht	0,084g +/- 0,027g	1,633g +/- 0,672g
Tiere mit Peritonealkarzinose	0/6	5/6
Tiere mit Lebermetastasen	0/6	4/6

Tab. 1 Übersicht Kolonkarzinom-Versuch

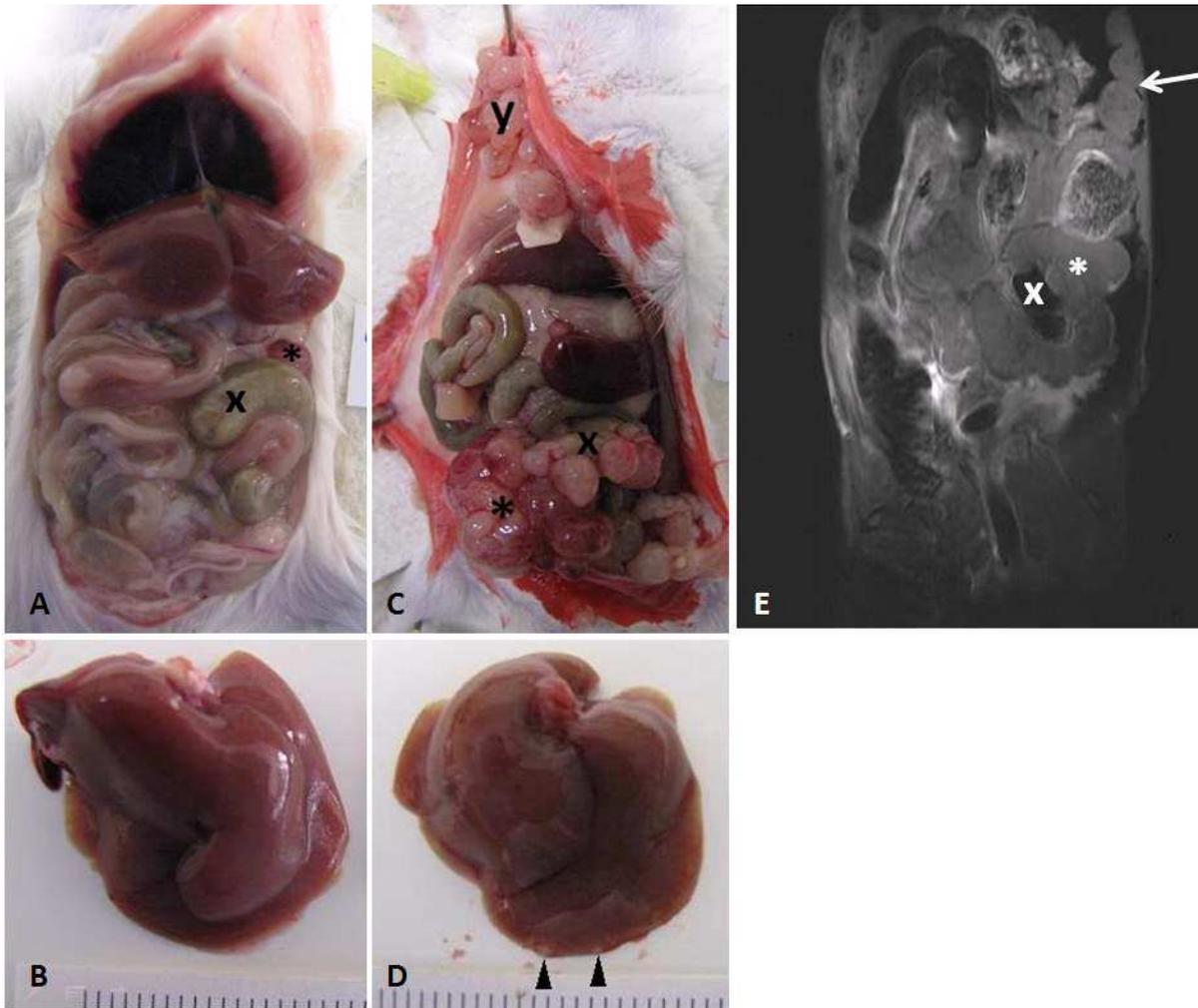


Abb. 13 Exploration im orthotopen Kolonkarzinommodell Kein Tier in der Makrophagen-depletierten Gruppe wies eine Peritonealkarzinose (**A**, x = Caecum, * = Kolonkarzinom), bzw. Lebermetastasen (**B**) auf. In der Kontrollgruppe hingegen zeigten 5 von 6 Tieren eine ausgeprägte Peritonealkarzinose (**C**, y = Bauchdeckenmetastasen) und 4 von 6 Tieren Lebermetastasen (**D**, Pfeilspitzen zeigen auf zwei Metastasen). (**E**) Das gleiche Tier wie in **C**, hier in T2-gewichteter Sequenz. Es zeigte sich das Tumorkonglomerat (*) um das Caecum (x), sowie die Tumorknoten entlang der Bauchwand (Pfeil).

Die Untersuchung der Tumormorphologie mittels HE-Färbung ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Gruppe, die Clodronat-Liposomen erhalten hatte und der Kontrollgruppe. Histologisch zeigten die Tumoren in beiden Gruppen eine geringe Differenzierung (Abb. 14).

Die Auswertung der F4/80- Immunhistochemie der Tumoren zeigte eine signifikant geringere Makrophagendichte innerhalb der Tumoren der Makrophagen-depletierten Gruppe mit

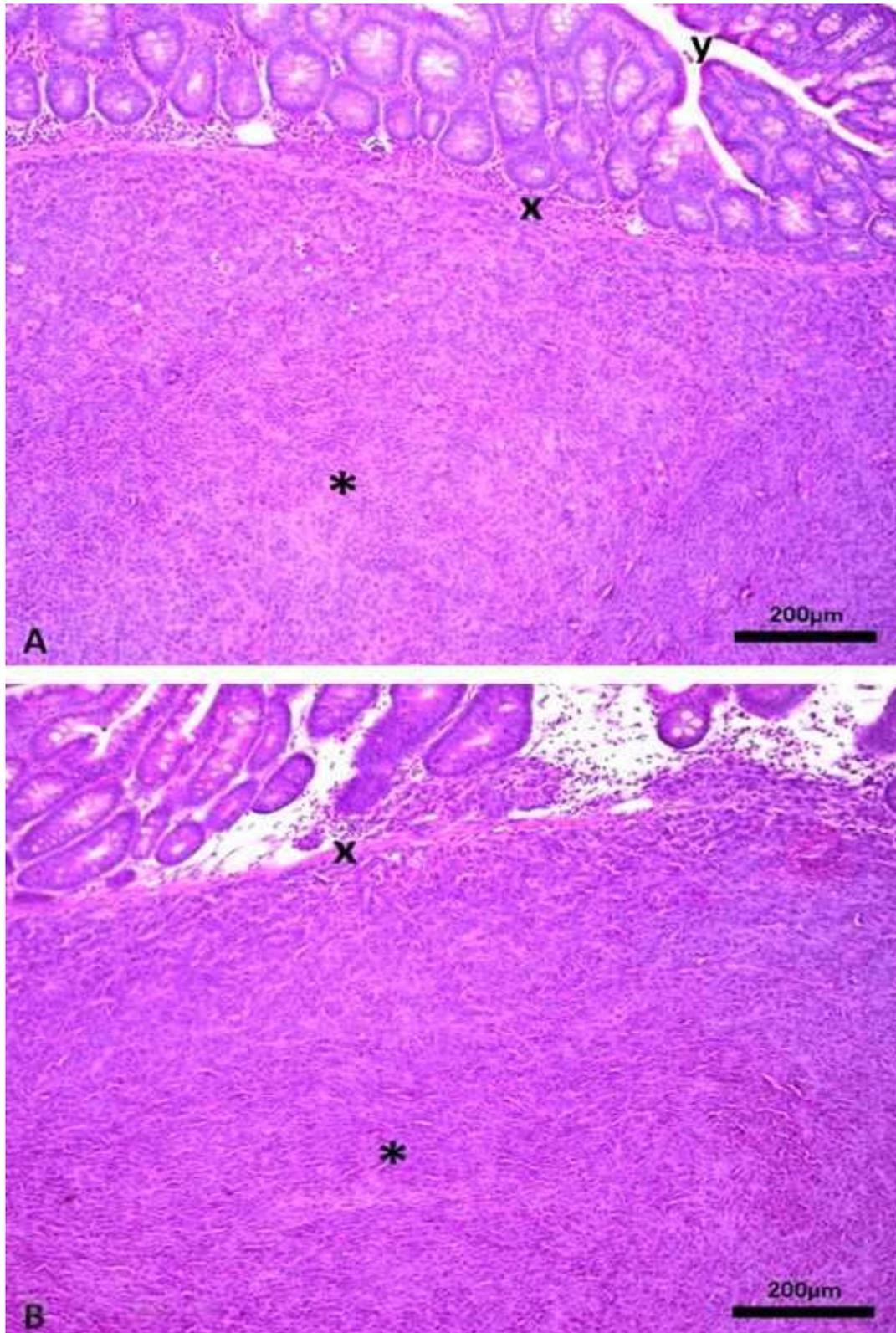


Abb. 14 HE-Färbung Repräsentative Ausschnitte zweier Tumoren aus der Makrophagen-depletierten Gruppe (**A**) und der Kontrollgruppe (**B**, * = Tumor, x = Lamina muscularis mucosae, y = Darmlumen).

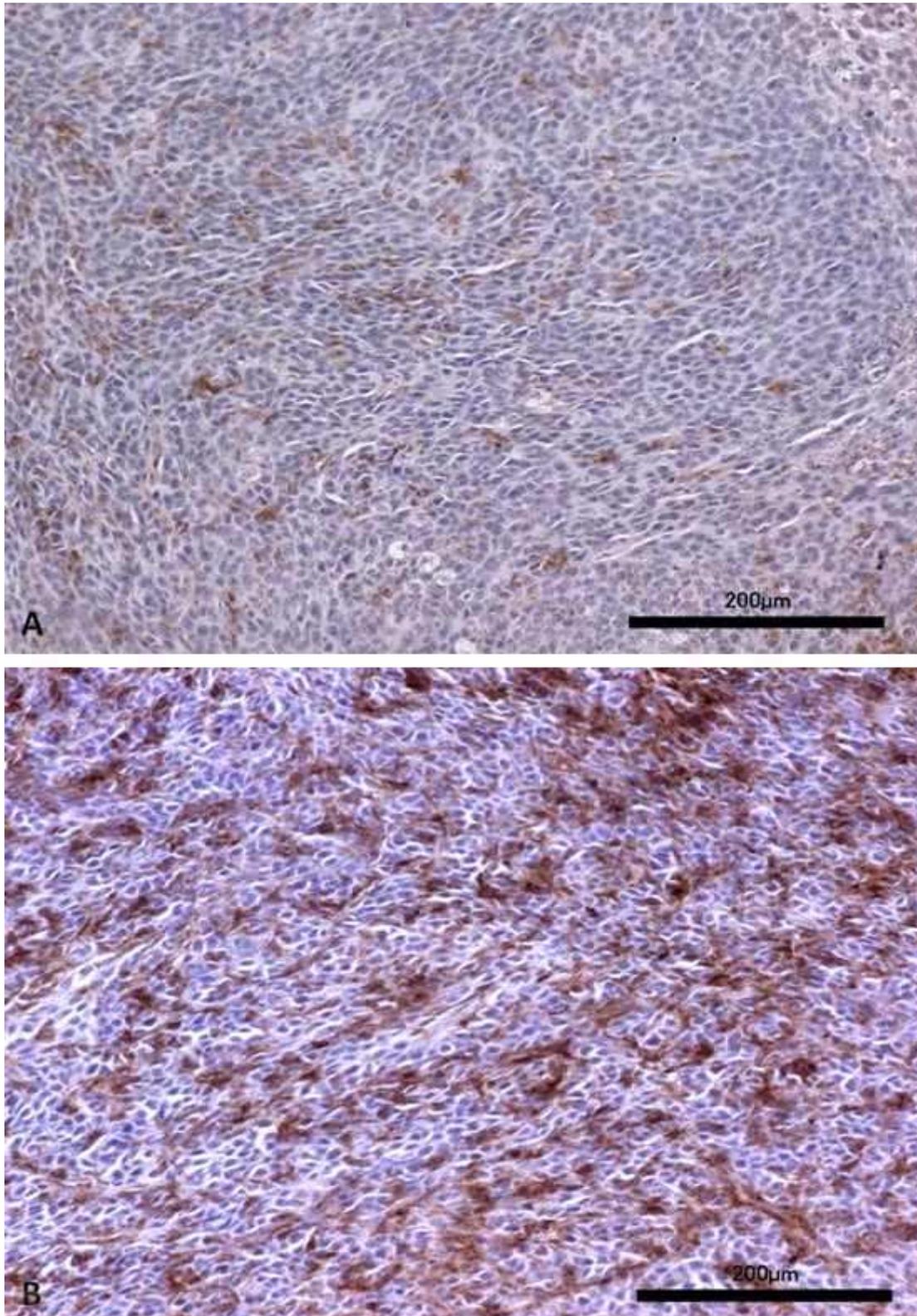


Abb. 15 F4/80-Immunhistochemie Immunhistochemische Anfärbung der Makrophagen mittels F4/80-Färbung. Repräsentative Ausschnitte zweier Tumoren aus der Makrophagen-depletierten Gruppe **(A)** und der Kontrollgruppe **(B)**.

Makrophagendichte im Kolonkarzinom

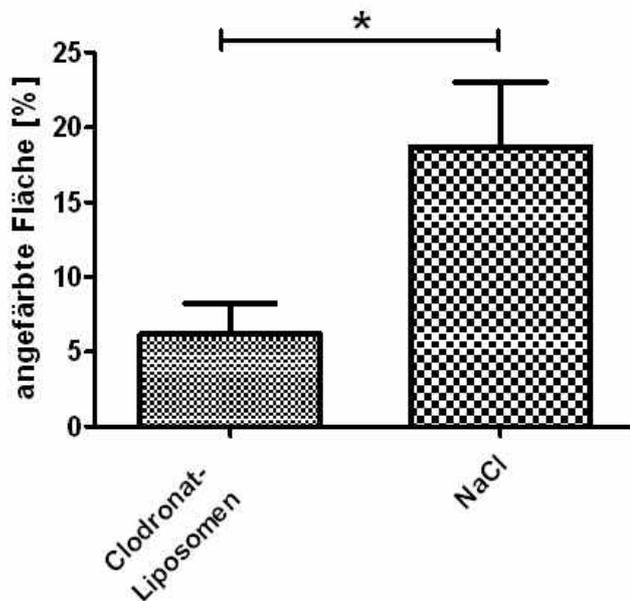


Abb. 16 Makrophagendichte
Auswertung der Makrophagendichte in den Primärtumoren mittels F4/80-Immunhistochemie ($p=0,026$).

einem Mittelwert von 6,2% +/- 2,0% im Vergleich zu den Tumoren aus der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 18,7% +/- 4,3% ($p = 0,026$; Abb. 15 und 16). In der Kontrollgruppe waren Makrophagen über die gesamten Tumorschnitte verteilt mit besonders hohen Dichten in Nekrosezonen und entlang der Invasionsfront. In der Makrophagen-depletierten Gruppe zeigte sich eine deutlich geringere Makrophagenzahl mit kleineren Ansammlungen ebenfalls in nekrotischen Arealen und entlang der Invasionsfront (Abb. 17). Nekrosezonen waren hier jedoch tendenziell seltener und kleiner im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Auswertung der CD-31-Immunhistochemie ergab eine signifikant geringere Gefäßdichte in der Makrophagen-depletierten Gruppe mit einem Mittelwert von 1,6 +/- 0,5 Gefäßen pro Gesichtsfeld, während Tumoren in der Kontrollgruppe im Mittel 8,8 +/- 1,6 Gefäße pro Gesichtsfeld besaßen ($p = 0,0043$, Abb. 18 und 19).

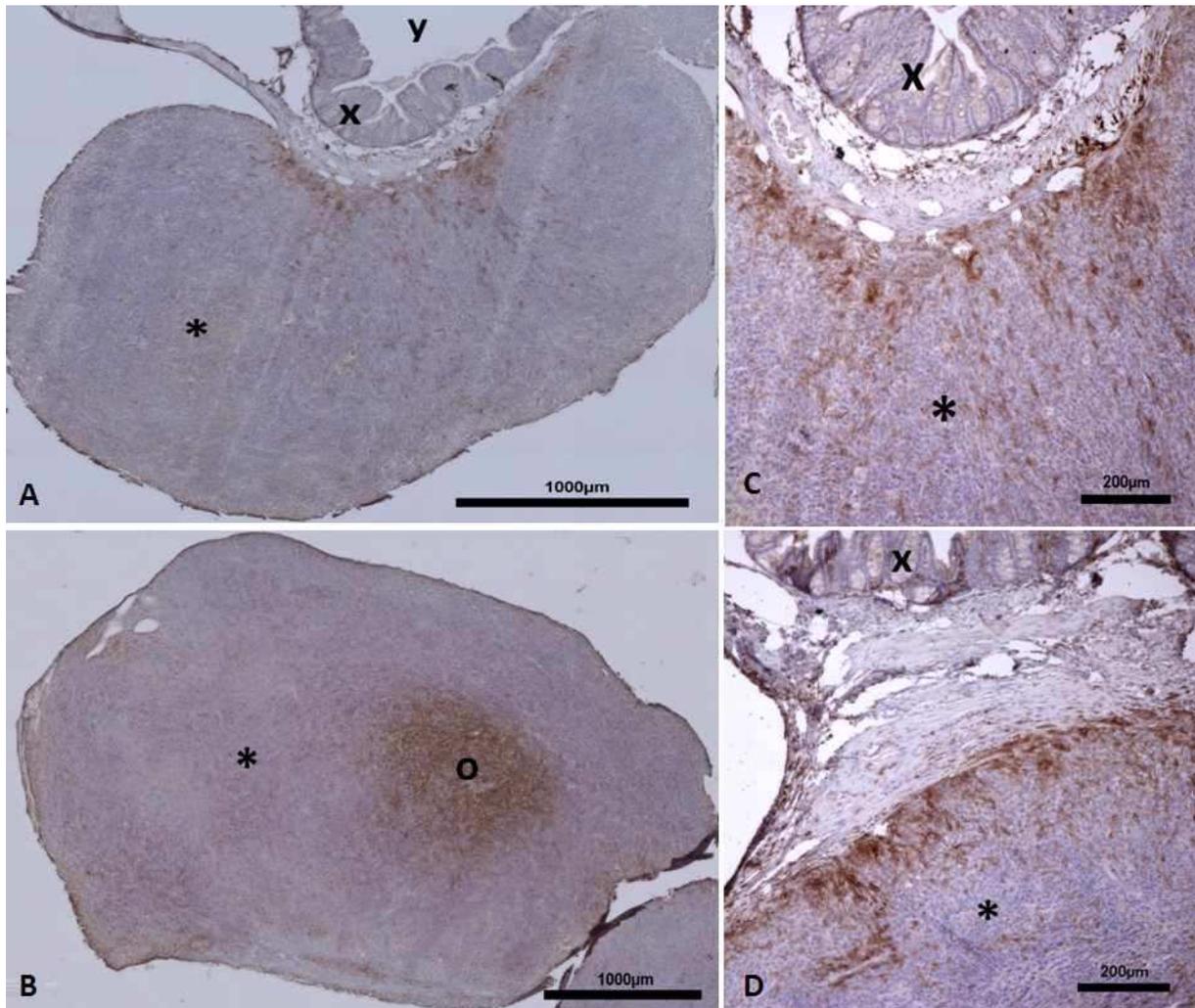


Abb. 17 Makrophagenverteilung in den Tumoren Übersicht über die Verteilung von Makrophagen in einem Tumor aus der Makrophagen-depletierten Gruppe mit Ansammlungen entlang der Invasionsfront (**A, C**). Darunter ein Tumor aus der Kontrollgruppe mit hohen Makrophagendichten in Nekrosezonen (**B**) und wiederum entlang der Invasionsfront (**D**, * = Tumor, x = Kolonepithel, y = Darmlumen, o = Nekrosezone, Färbung mittels F4/80-Immunhistochemie).

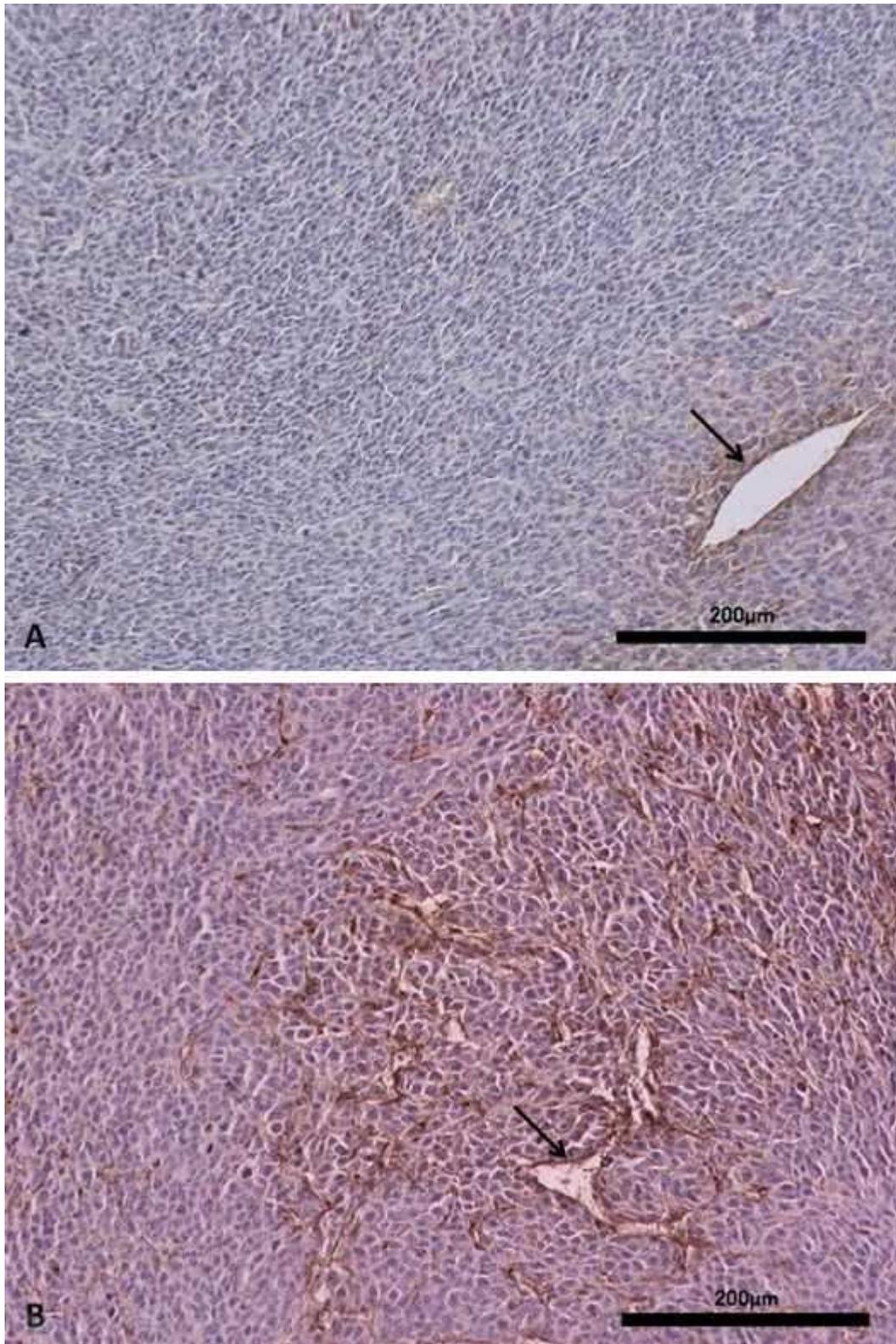


Abb. 18 CD-31-Immunhistochemie Darstellung der Gefäße mittels immunhistochemischer CD-31-Färbung. Repräsentative Ausschnitte zweier Tumoren aus der Makrophagen-depletierten Gruppe mit geringer (**A**) und aus der Kontrollgruppe mit hoher Gefäßdichte (**B**, Pfeile zeigen beispielhaft auf zwei Gefäße).

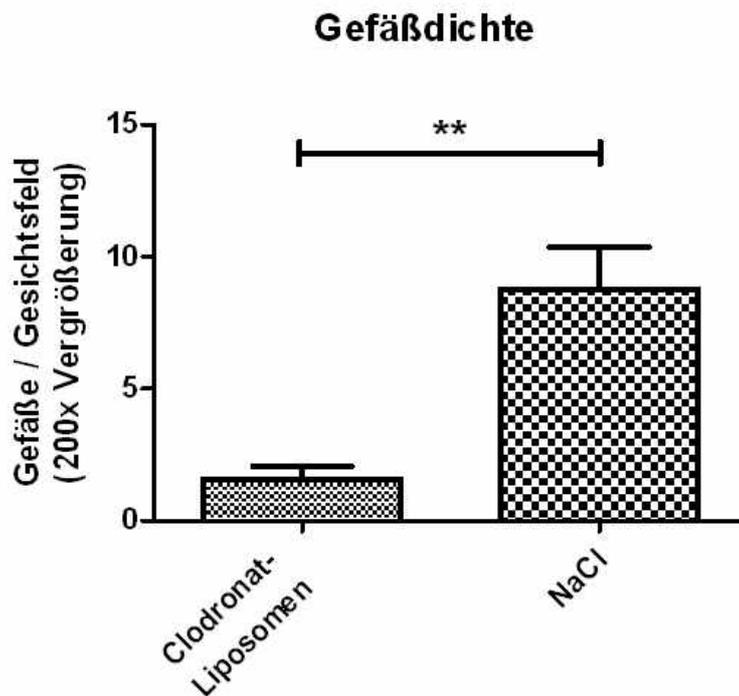


Abb. 19 Gefäßdichte
Auswertung der Gefäßdichte in den primären Kolonkarzinomen mittels CD-31-Immunhistochemie ($p=0,0043$).

3.3 Lebermetastasenmodell

Im Lebermetastasenmodell lebten bei Beendigung des Versuches noch 6 von 15 Tieren in der Gruppe, die Clodronat-Liposomen erhalten hatte und 8 von 8 (PBS-Liposomen) bzw. 7 von 7 (NaCl) Tieren in den beiden Kontrollgruppen. Die Mäuse in der Kupffer-Zell-depletierten (Clodronat-) Gruppe wiesen mit $14,3 \pm 7,7$ signifikant weniger Metastasen auf als die Tiere in den beiden Kontrollgruppen mit $118,5 \pm 28,2$ Metastasen in der PBS-Liposomen-Gruppe und $81,7 \pm 23,2$ in der NaCl-Gruppe (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,015$, Mann-Whitney: $p = 0,0117$ (Clodronat- – PBS-Liposomen), $p = 0,0266$ (Clodronat-Liposomen – NaCl)). Der Vergleich der beiden Kontrollgruppen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,3969$; Abb. 20 bis 23).

Unterschiede in der Tumorlast konnten ebenfalls wiedergespiegelt werden, indem die Lebern mittels Feinwaage gewogen wurden. Lebern in der Kupffer-Zell-depletierten Gruppe waren signifikant leichter mit einem Mittelwert von $0,9169 \pm 0,1012$ g, verglichen mit den beiden Kontrollgruppen mit Mittelwerten von $1,415 \pm 0,086$ g in der PBS-Liposomen-

Gruppe und $1,270 \pm 0,0443$ in der NaCl-Gruppe (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,0229$, Mann-Whitney: $p = 0,0127$ (Clodronat- – PBS-Liposomen), $p = 0,035$ (Clodronat-Liposomen – NaCl), $p = 0,3969$ (PBS-Liposomen – NaCl), Abb. 20). Metastasen auf der Leberoberfläche zeigten sich als solitäre, noduläre Tumoren.

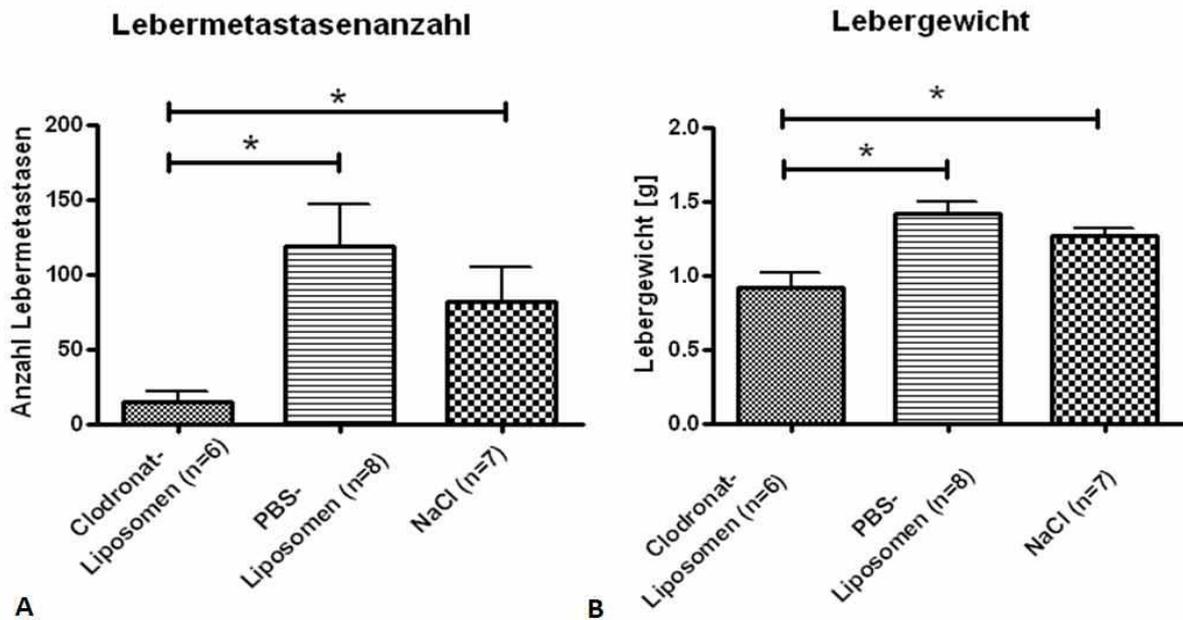


Abb. 20 Lebermetastasenanzahl und Lebergewicht Auswertung der Lebermetastasenanzahl in den drei Gruppen (**A**, $p=0,015$) und Bestimmung des Lebergewichtes (**B**, $p=0,0229$).

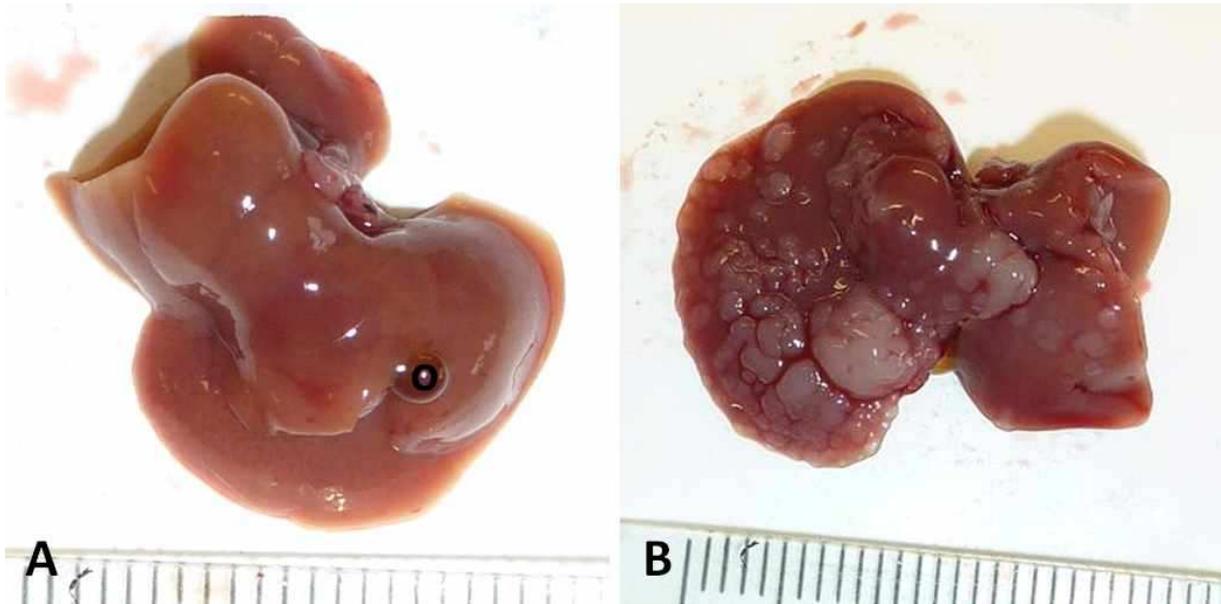


Abb. 21 Bestimmung der Lebermetastasenanzahl mittels Exploration (A) Leber einer Maus aus der Makrophagen-depletierten Gruppe ohne äußerlich sichtbare Metastasen bei der Exploration (o = Gallenblase). (B) Leber einer Maus aus der Kontrollgruppe mit multiplen oberflächlich sichtbaren Metastasen.

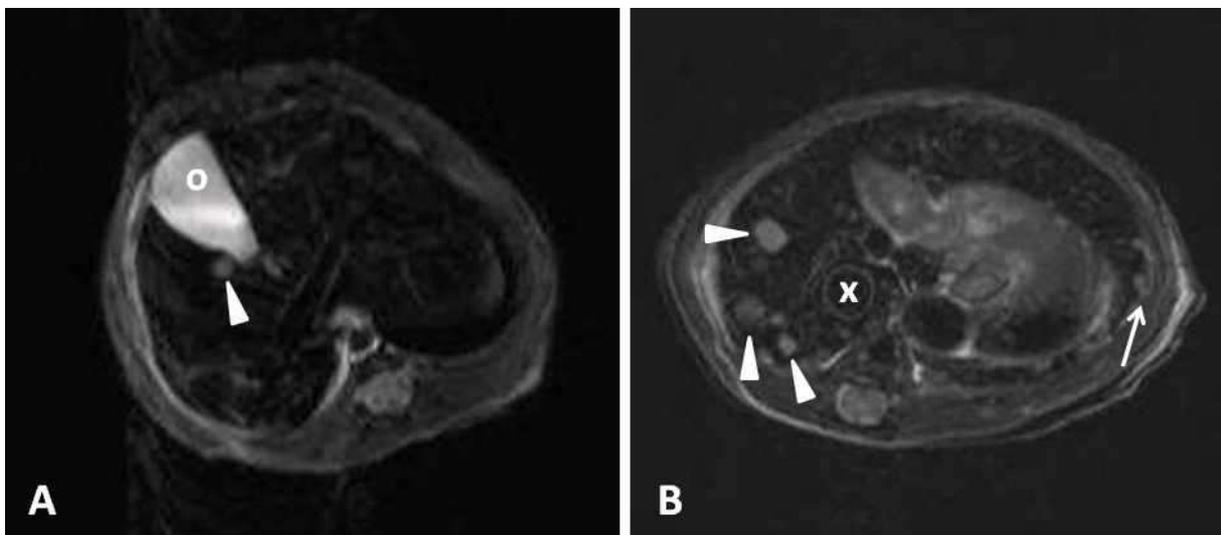


Abb. 22 Bestimmung der Lebermetastasenanzahl mittels T2-gewichteter MRT-Sequenzen (A) MRT einer Maus aus der Makrophagen-depletierten Gruppe ohne äußerlich sichtbare Metastasen (siehe Abb. 21A), jedoch im MRT darstellbarer Lebermetastase in direkter Nachbarschaft zur Gallenblase. (B) Leber einer Maus aus der Kontrollgruppe mit multiplen Lebermetastasen, teils mit, teils ohne Kontakt zur Leberoberfläche (Pfeil = Metastase mit Kontakt zur Leberoberfläche, Pfeilspitzen = Metastasen ohne Kontakt zur Leberoberfläche, o = Gallenblase, x = Vena Cava).

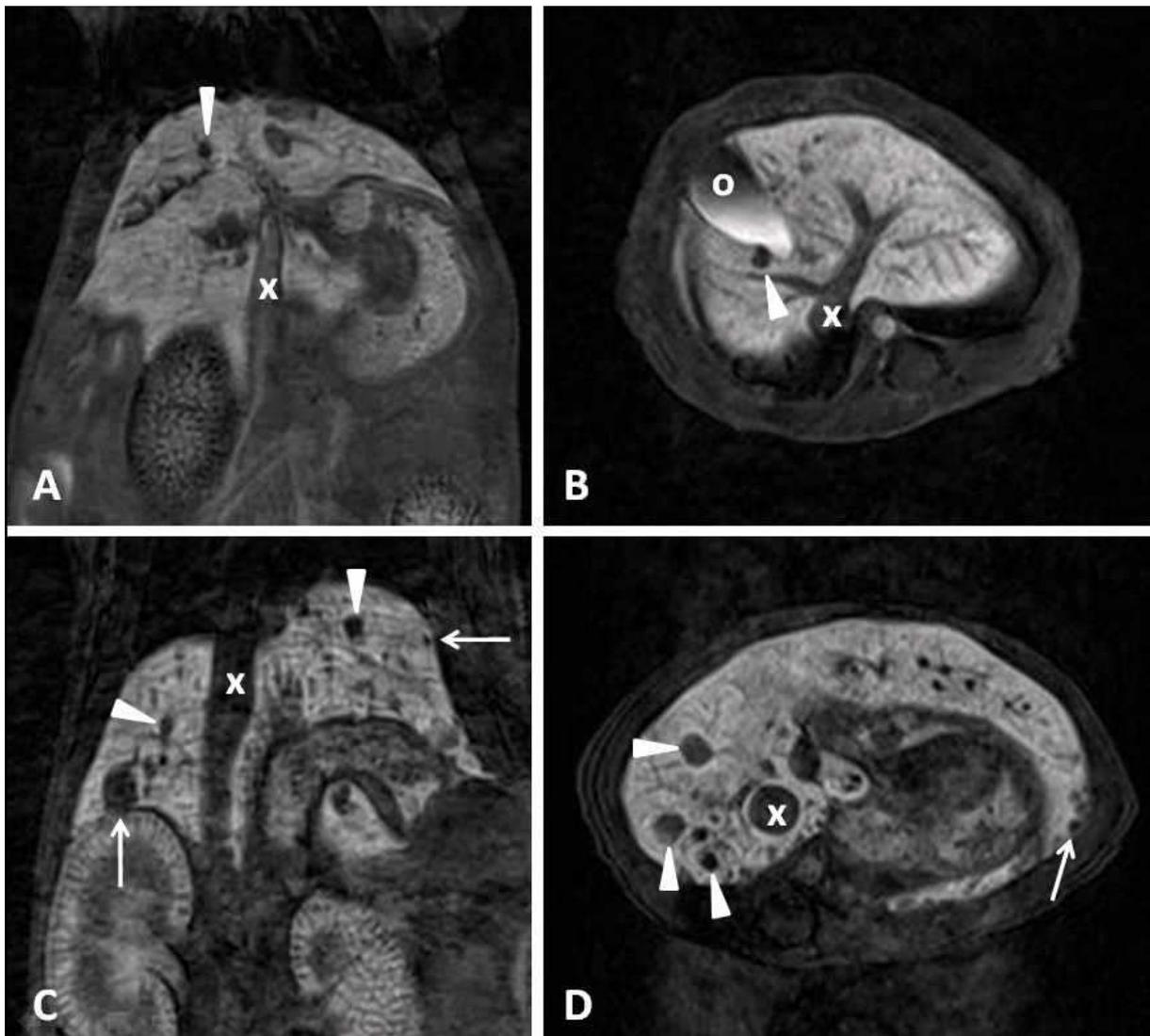


Abb. 23 Bestimmung der Lebermetastasenanzahl mittels MRT unter Verwendung einer T1-Vibe-Sequent mit Primovist® als Kontrastmittel (A, B) MRT einer Maus aus der Makrophagen-depletierten Gruppe ohne äußerlich sichtbare Metastasen (siehe Abb. 21A und 22A), jedoch im MRT darstellbarer Lebermetastase in direkter Nachbarschaft zur Gallenblase unter Verwendung von Kontrastmittel. (C, D) Leber einer Maus aus der Kontrollgruppe mit multiplen Lebermetastasen, teils mit, teils ohne Kontakt zur Leberoberfläche (siehe auch Abb. 22B). Exemplarisch sind hier nur einige der sichtbaren Metastasen markiert (Pfeile = Metastasen mit Kontakt zur Leberoberfläche, Pfeilspitzen = Metastasen ohne Kontakt zur Leberoberfläche, o = Gallenbase, x = Vena Cava).

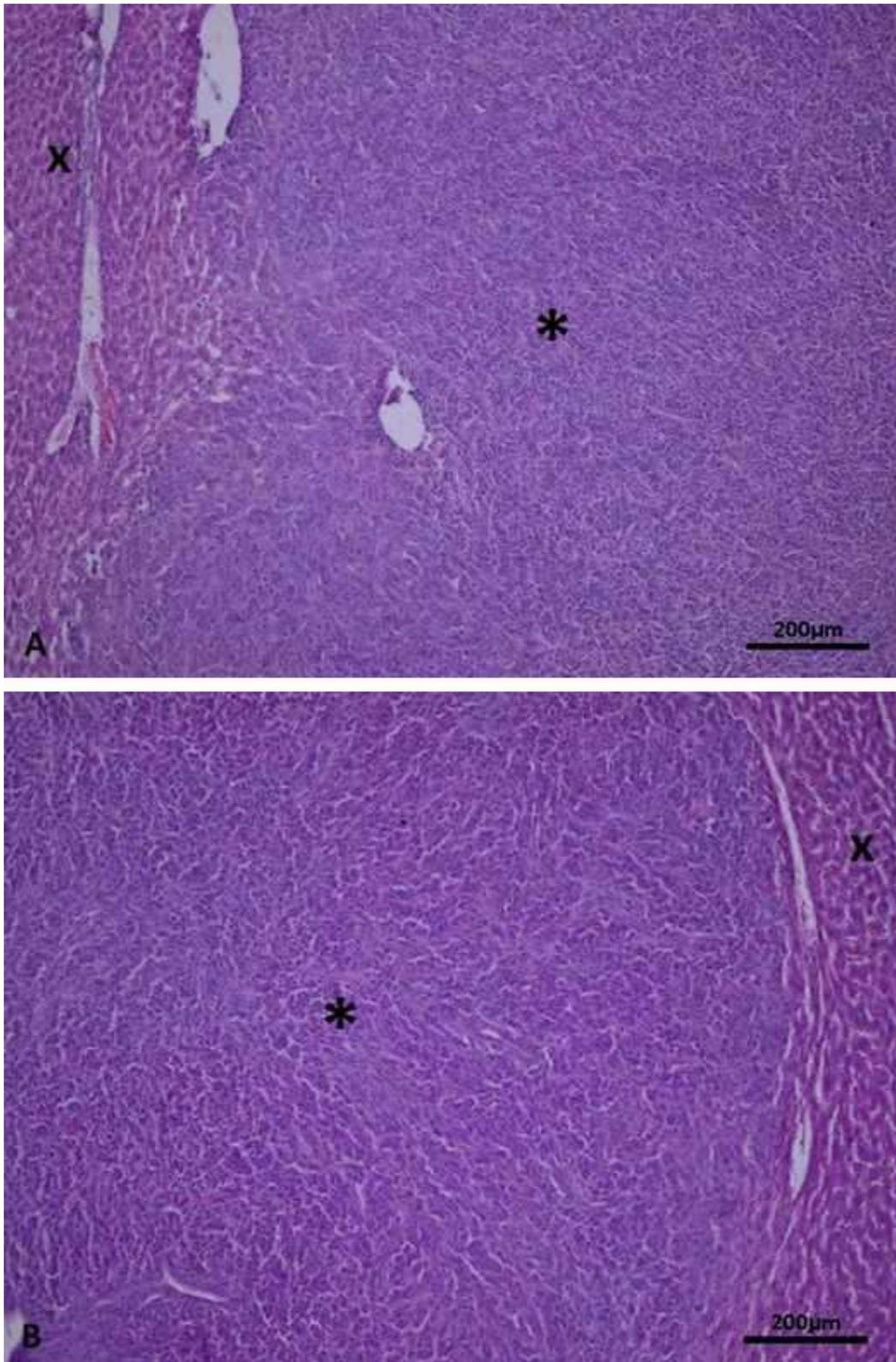


Abb. 24 HE-Färbung Repräsentative Ausschnitte zweier Lebermetastasen aus der Kupffer-Zell-depletierten Gruppe (A) und der Kontrollgruppe (B, * = Metastase, x = Leberparenchym).

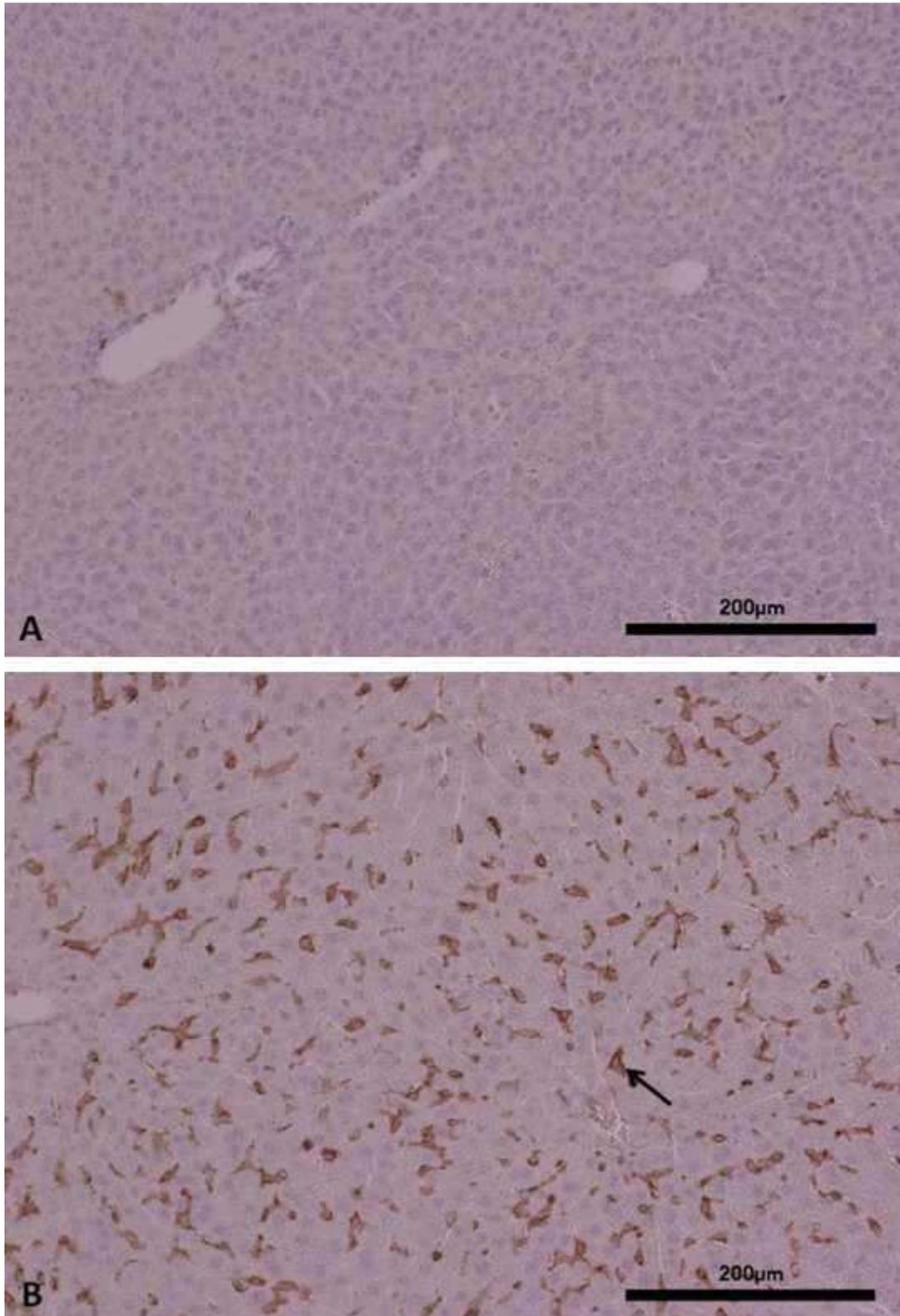


Abb. 25 F4/80-Immunhistochemie Anfärbung der Kupffer-Zellen in der Leber mittels F4/80-Immunhistochemie. Beispielhafte Ausschnitte aus dem Leberparenchym der Tiere, die mit Clodronat-Liposomen **(A)** bzw. PBS-Liposomen **(B)** behandelt wurden. Der Pfeil weist beispielhaft auf eine Kupffer-Zelle.

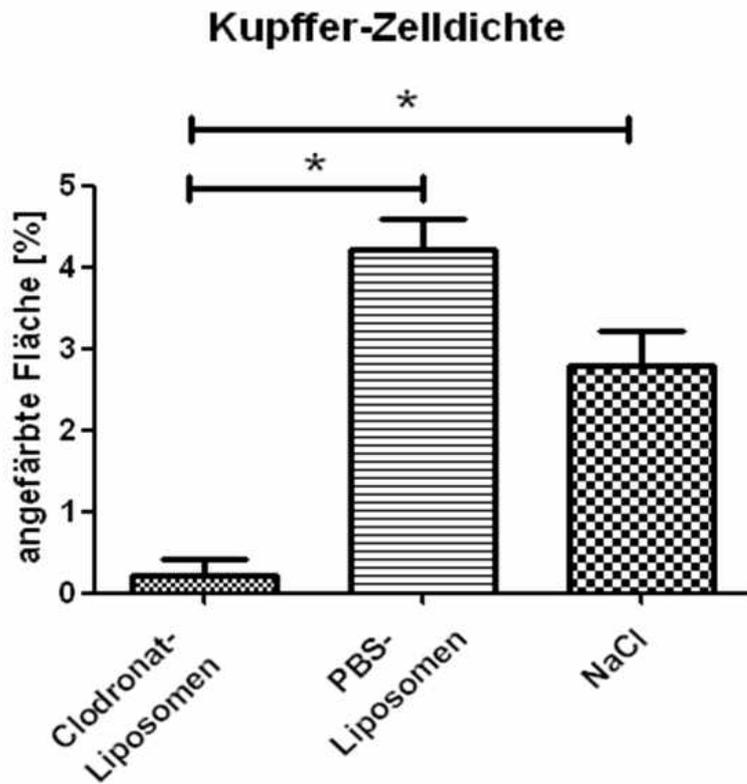


Abb. 26 Kupffer-Zelldichte in der Leber Bestimmung der Kupffer-Zelldichte im Leberparenchym mittels F4/80-Immunhistochemie ($p=0,0097$).

Die Untersuchung der Metastasenmorphologie mittels HE-Färbung ergab keine erkennbaren Unterschiede zwischen der Kupffer-Zell-depletierten Gruppe und den beiden Kontrollgruppen (Abb. 24).

In der F4/80-Immunhistochemie ergab sich eine signifikant geringere Kupffer-Zelldichte in der Gruppe, die Clodronat-Liposomen erhalten hatte mit einem Mittelwert von 0,21% +/- 0,19%, wohingegen die beiden Kontrollgruppen mit 4,22% +/- 0,38% (PBS-Liposomen) und 2,80% +/- 0,41% (NaCl) deutlich höhere Werte aufwiesen (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,0097$, Mann-Whitney-Test: $p = 0,0286$ (Clodronat- - PBS-Liposomen), $p = 0,0286$ (Clodronat-Liposomen - NaCl). Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen waren nicht signifikant ($p= 0,0571$; Abb. 25 und 26).

Im Lebermetastasenmodell ergab sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Kupffer-Zelldichte und der Anzahl der Lebermetastasen ($p = 0,0221$, $r_s = 0,6044$). Eine niedrige Kupffer-Zelldichte war verbunden mit einer niedrigen Lebermetastasenanzahl, eine hohe Dichte ging mit einer erhöhten Metastasenanzahl einher (Abb. 27).

Korrelation Kupfer-Zelldichte - Metastasen

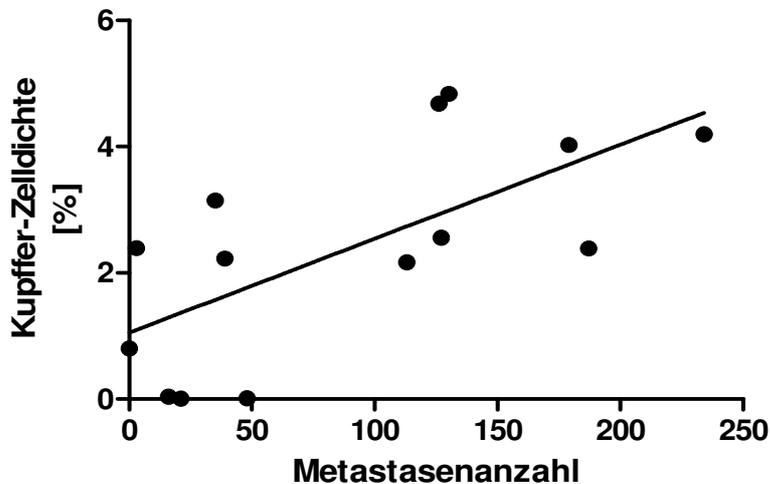


Abb. 27 Korrelation Kupfer-Zelldichte – Metastasenanzahl

Direkte Korrelation zwischen der Kupfer-Zelldichte im Leberparenchym und der Metastasenanzahl in der Leber ($p=0,0221$, $r_s=0,6044$).

Die Auswertung der Makrophagendichte innerhalb der Lebermetastasen ergab keine statistische Signifikanz zwischen den drei Gruppen (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,2034$) und auch die Untersuchung der durchschnittlichen Größe der Metastasen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen mit Durchmessern zwischen $51\mu\text{m}$ und $4270\mu\text{m}$ (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,1557$). Jedoch konnte eine inverse Korrelation zwischen der Makrophagendichte innerhalb der Lebermetastasen und dem Durchmesser der Metastasen in der Clodronat- und der PBS-Liposomen-Gruppe nachgewiesen werden (Spearman-Test: $p = 0,0341$ (Clodronat-Liposomen), $p < 0,0001$ (PBS-Liposomen)). Kleine Metastasen zeigten eher eine dichte Makrophageninfiltration, während sie mit zunehmender Metastasengröße abnahm. Die gleiche Tendenz konnte bei Metastasen in der NaCl-Gruppe festgestellt werden, wobei die Ergebnisse hier keine Signifikanz erreichten ($p = 0,1$; Abb. 28).

Die Lokalisation der Metastasen in Bezug auf die Leberoberfläche folgte einer exponentiellen Kurve in allen drei Gruppen. Der Großteil der Metastasen befand sich direkt an oder unter der Glisson'schen Kapsel, während die Metastasenanzahl mit zunehmender Entfernung zur Leberoberfläche stetig abnahm. Insgesamt befanden sich 55% (Clodronat-Liposomen), 49% (PBS-Liposomen) bzw. 52% (NaCl) der Metastasen in einem Bereich von $0\mu\text{m}$ bis $250\mu\text{m}$ unter der Glisson-Kapsel (Abb. 29).

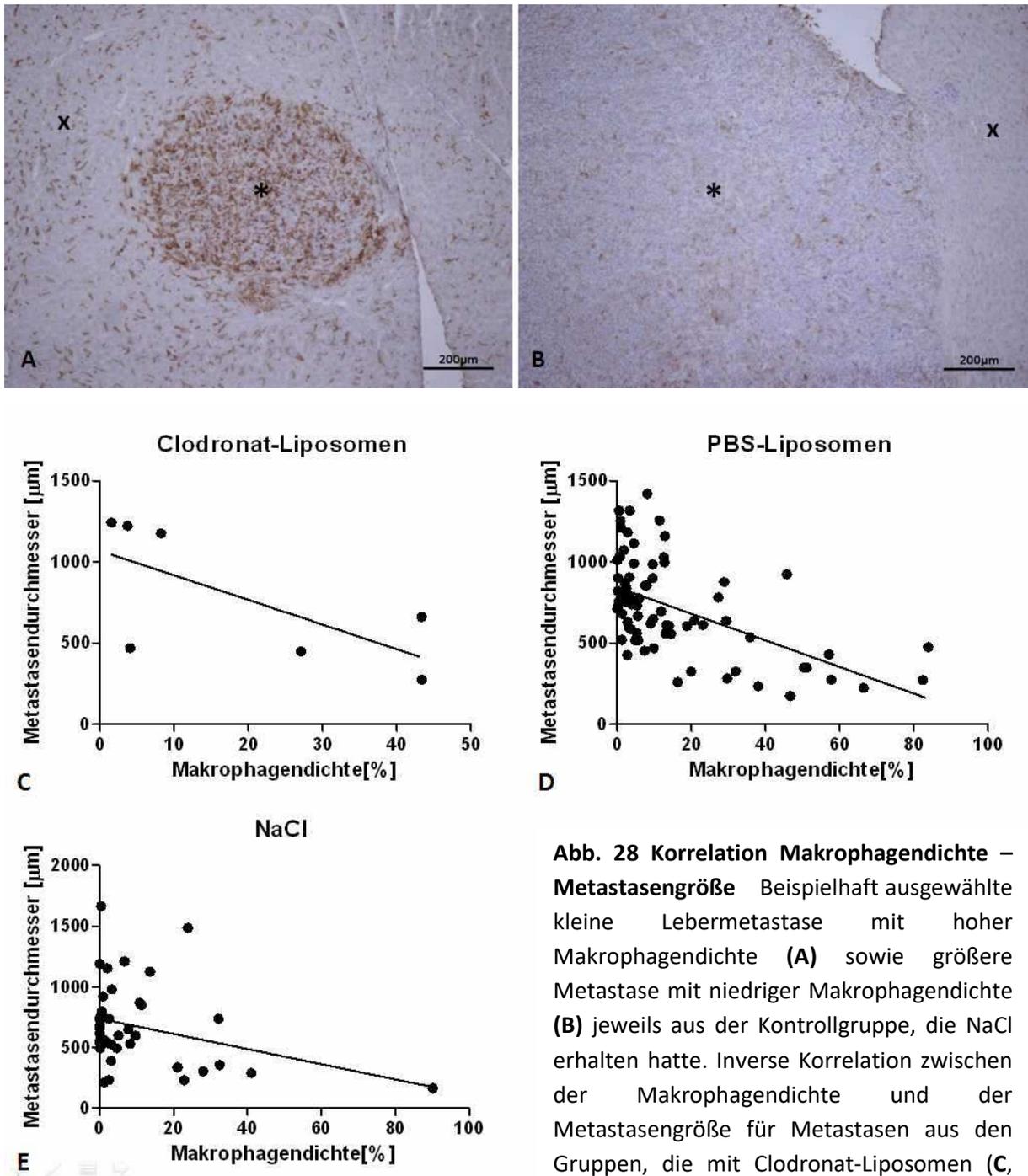


Abb. 28 Korrelation Makrophagedichte – Metastasengröße Beispielhaft ausgewählte kleine Lebermetastase mit hoher Makrophagedichte (**A**) sowie größere Metastase mit niedriger Makrophagedichte (**B**) jeweils aus der Kontrollgruppe, die NaCl erhalten hatte. Inverse Korrelation zwischen der Makrophagedichte und der Metastasengröße für Metastasen aus den Gruppen, die mit Clodronat-Liposomen (**C**, $p=0,0341$), PBS-Liposomen (**D**, $p=0,0001$) bzw. NaCl (**E**, $p=0,1$) behandelt wurden.

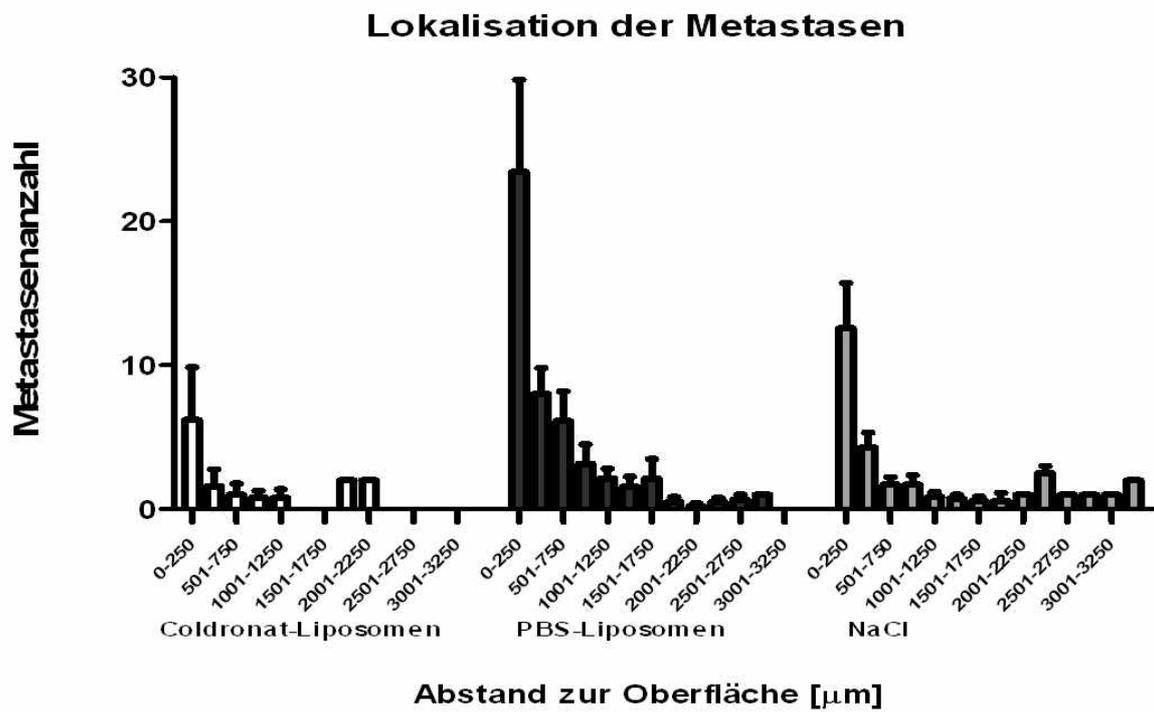


Abb. 29 Lokalisation der Metastasen Lokalisation der Metastasen in Bezug auf die Oberfläche der Leber.

3.4 Untersuchungen zur Verbesserung der MRT-Bildgebung des Darmes in der Maus

Die abführenden Maßnahmen erzielten in den Tieren zum Untersuchungszeitpunkt einen nahezu vollständig entleerten Darm und somit optimale Voraussetzungen zur Bildgebung. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Substanzen zur Füllung des Darmes getestet. Die Insufflation von Luft führte zu einer verstärkten Peristaltik des Darmes. Die Füllung mit Wasser und anschließende Anwendung einer T2-gewichteten MRT-Sequenz brachte ebenfalls keine überzeugenden Ergebnisse, da die Peristaltik zwar vermindert, jedoch bei einer Messdauer von 12-15 Minuten pro Sequenz, die Bildqualität weiterhin negativ beeinflusst wurde.

Erst die Befüllung des Darmes mit Kochsalzlösung sowie Buscopan mit nachfolgend durchgeführter T1-gewichteter, hochauflösender Vibe-Sequenz führte zu einer wesentlichen Verbesserung der Darstellung des Kolons im MRT. Durch das Gewicht des Einlaufes als auch durch die Verwendung von Buscopan konnte die Darmperistaltik deutlich vermindert werden. Zum anderen verringerte die Verwendung der T1-gewichteten flash-3D-Vibe-Sequenz die Untersuchungszeit erheblich, sodass auch hierdurch eine verringerte Anfälligkeit für Bewegungsartefakte durch Peristaltik oder Atmung erzielt werden konnte. Die transrektale Applikation von Kontrastmittel führte zu einem kontrastierten Darmlumen, wohingegen die Darmwand dunkel erschien (Abb. 30). Durch das Einlegen von Pausen während des Einfüllens von Kochsalzlösung in den Darm konnte vermieden werden, dass der Darm zu sehr und zu schnell gedehnt wurde. Meist konnten auch weit apikal gelegene Dünndarmabschnitte befüllt und somit der Bildgebung zugänglich gemacht werden. Stuhlüberreste konnten aufgrund ihrer inhomogenen Struktur mit festen, flüssigen und gasförmigen Anteilen gut identifiziert werden. Auch Luftblasen waren aufgrund ihrer runden, homogenen Struktur gut von pathologischen Läsionen wie zum Beispiel einer Stenose zu unterscheiden.

Die intravenöse Gabe von Kontrastmittel führte hingegen zu einem dunklen Darmlumen und einer nun kontrastierten Darmwand (Abb. 31). Hierbei konnten pathologische Veränderungen als auch die Dicke der Darmwand beurteilt werden. Beide Methoden erwiesen sich als gut reproduzierbar und es konnte eine hohe Bildqualität erzielt werden.

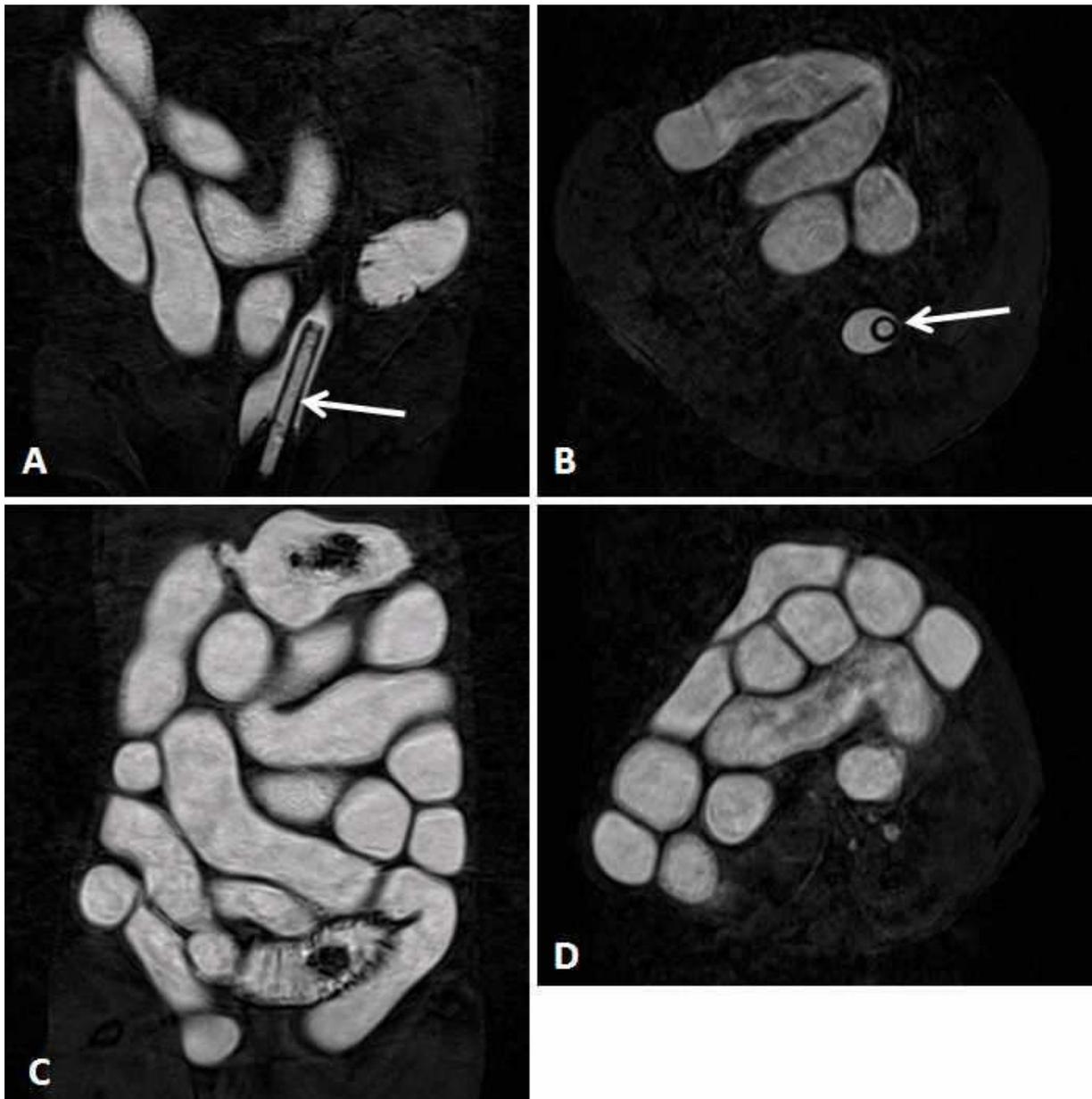


Abb. 30 MRT-Bildgebung des Darmes durch Kontrastierung des Darmlumens MRT-Untersuchung des Darmes einer gesunden Maus mittels Omniscan-Kontrastmitteleinlauf und hochauflösender T1-gewichteter Vibe-Sequenz. Der im Rektum einliegende Angiographie-Katheter zur Applikation des Kontrastmitteleinlaufes ist koronar (**A**) und auch transversal (**B**) angeschnitten sichtbar (Pfeile). Auf den unteren beiden Abbildungen sind zwei repräsentative Beispiele dargestellt, die verdeutlichen, welche Bildqualität mit der neuen Methode zur Bildgebung möglich ist (**C** - koronar, **D** - transversal). Der Darm der Maus ist bis in obere Dünndarmabschnitte einsehbar.

Gleichzeitig schienen die Tiere die Untersuchung gut zu verkraften. Durch die Verwendung der Vibe-Sequenz anstatt von T2-gewichteten Sequenzen konnte die Messzeit für die vollständige Untersuchung einer Maus mit 2-3 Sequenzen auf etwa 12-15 Minuten reduziert

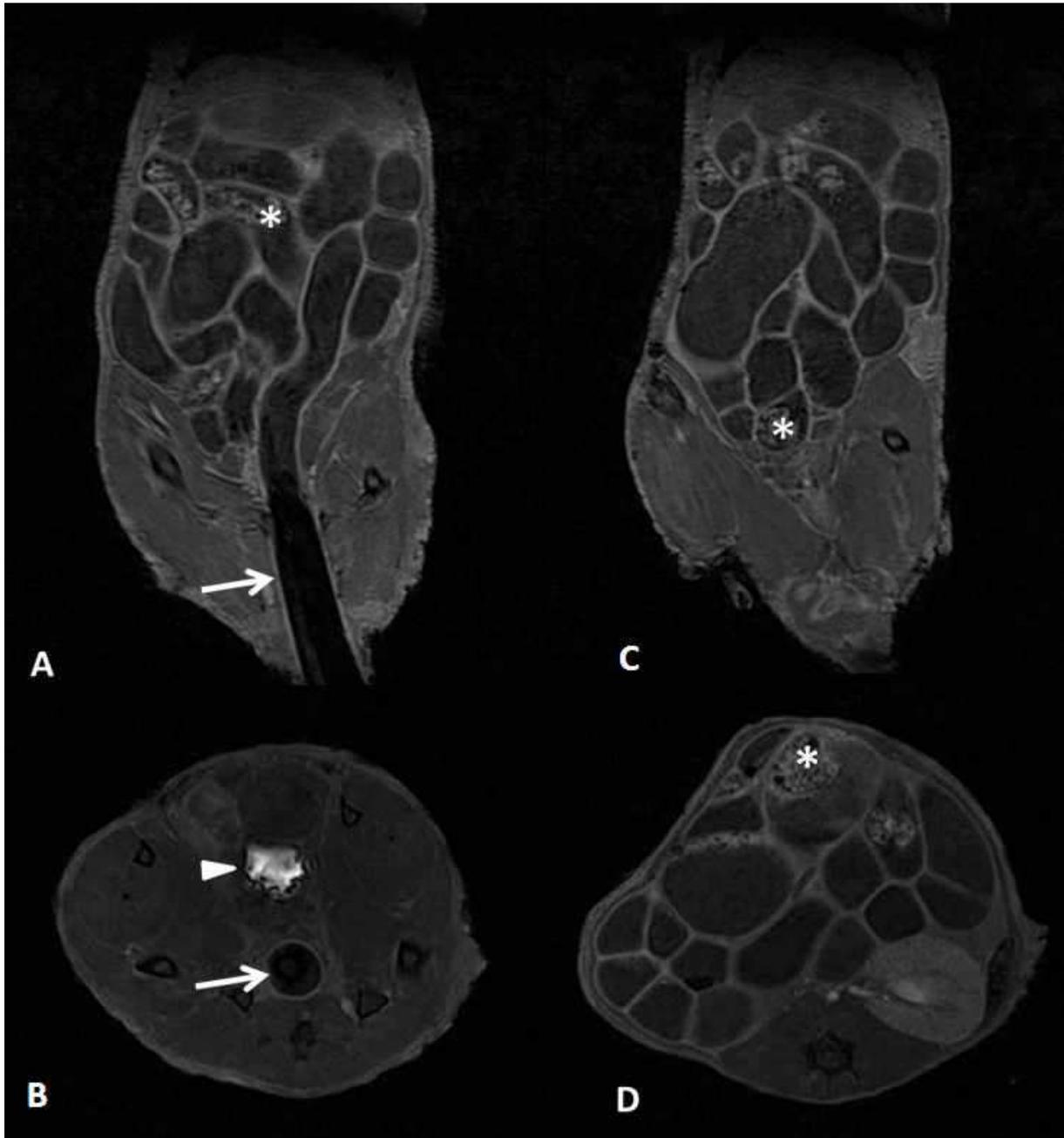


Abb. 31 MRT-Bildgebung des Darmes durch Kontrastierung der Darmwand MRT-Untersuchung des Darmes einer gesunden Maus mit intravenöser Kontrastmittel-Gabe und T1-gewichteter Vibe-Sequenz. Der im Rektum einliegende Angiographie-Katheter zur Applikation des mit Butylscopolamin versetzten Einlaufes ist erneut koronar (**A**) und auch transversal (**B**) angeschnitten sichtbar (Pfeile). Auf den rechten Abbildungen sind jeweils wieder zwei repräsentative Beispiele dargestellt, die verdeutlichen, welche Bildqualität mit der neuen Methode zur Bildgebung möglich ist (**C** - koronar, **D** - transversal, Pfeilspitze = kontrastmittelgefüllte Blase, * = Stuhlreste).

werden. Nach Beendigung der Untersuchung lief ein Großteil der Kochsalzlösung unmittelbar nach Ziehen des Katheters aus dem Darm heraus und etwa 30 Minuten nach Beendigung der Narkose bewegten sich die Tiere bereits wieder lebhaft durch den Käfig. Auch wiederholte Messungen zur longitudinalen Bildgebung des Darmes wurden von den Mäusen gut toleriert. Bei über hundert durchgeführten Untersuchungen mit dieser Methode haben bisher alle Tiere die Prozedur überlebt.

Die Auswertung der erzeugten MRT-Bilder mittels MIPAV ermöglichte einen weiteren Informationsgewinn beispielsweise durch Ermittlung der Darmwanddicke oder durch Volumetrie von pathologischen Veränderungen. Durch Verwendung der Software syngo fastView konnte bei der Untersuchungsmethode mit kontrastiertem Darmlumen ein 3D-Modell des Darmes erstellt werden, welches sich unter anderem bei der Suche nach Darmstenosen als hilfreich erwies (Abb. 32).

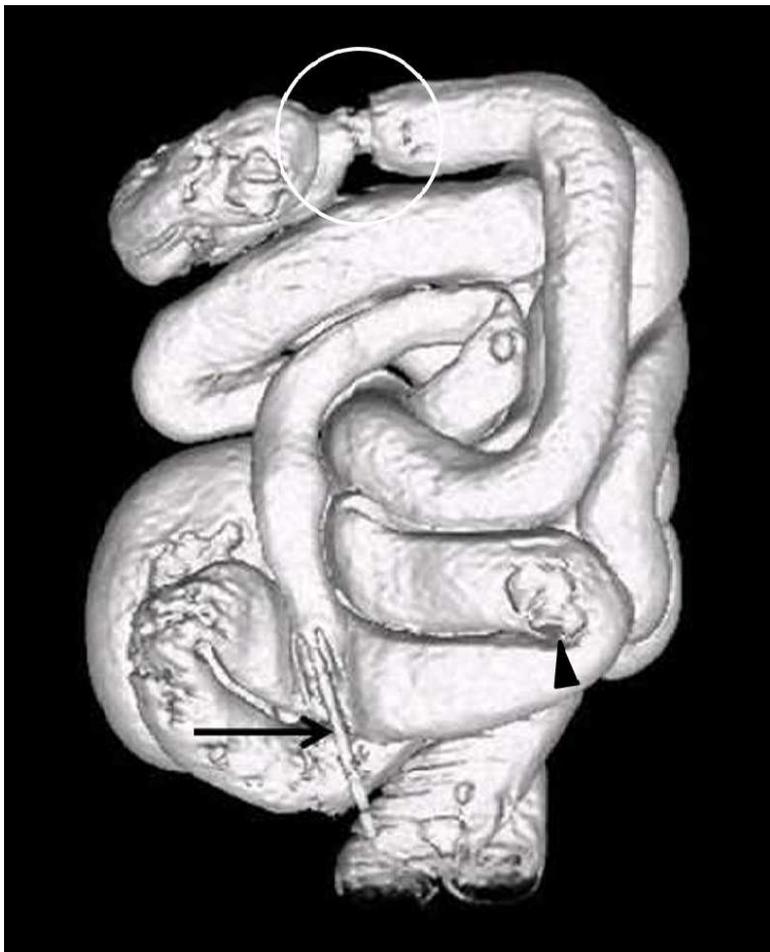


Abb. 32 3D-Rekonstruktion des Darmes Blick von dorsal auf den Darm. Die einzelnen Darmschlingen sind gut voneinander abgrenzbar. Stenosen (siehe Umkreisung) oder Wandunregelmäßigkeiten könnten mit hoher Wahrscheinlichkeit detektiert werden. Der Pfeil weist auf die Spitze des im Rektum einliegenden Angiographie-Katheters. Einzelne Stuhlreste zeigen sich noch im Darm (exemplarisch siehe Pfeilspitze).

4 Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zwei Modelle, ein orthotopes Kolonkarzinommodell und ein Lebermetastasenmodell, verwendet, um den Einfluss von Makrophagen auf die Proliferation, die Neoangiogenese und die Formation von Metastasen im Kolonkarzinom der Maus zu untersuchen. Die Makrophagendepletion resultierte in einer erheblichen Verringerung des Tumorwachstums sowie der Angiogenese und verhinderte die Ausbildung einer Peritonealkarzinose und von Lebermetastasen im orthotopen Modell. Im Lebermetastasenmodell führte die Kupffer-Zelldepletion zu einer signifikant geringeren Anzahl an Lebermetastasen. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass tumor-assoziierte Makrophagen eine tumor-unterstützende Rolle im Kolonkarzinom, wie auch in anderen malignen Erkrankungen ausüben, und dass Kupffer-Zellen einen entscheidenden Promotor bei den ersten Schritten der Lebermetastasierung darstellen könnten.

Eine Vielzahl von Studien hat sowohl im Tierversuch als auch in humanen Präparaten für mehrere Tumorentitäten den Einfluss tumor-assoziiierter Makrophagen untersucht. In einem Großteil dieser Studien konnte gezeigt werden, dass Makrophagen einen wachstums- und metastasierungsfördernden Effekt haben, wie zum Beispiel beim Pankreas-, Mamma-, Endometrium-, Blasen- und Prostatakarzinom^{31-35,80}. Einige andere Arbeiten hingegen sprachen tumor-assoziierten Makrophagen beim Bronchial- und Magenkarzinom einen Prognose-verbessernden Effekt zu^{38,39}.

Bezüglich des Einflusses von Makrophagen auf das Tumorwachstum im Kolonkarzinom wurden bisher gegensätzliche Ergebnisse veröffentlicht. Einige Studien beschrieben eine Korrelation zwischen einer hohen Makrophageninfiltration entlang der Invasionsfront und einer günstigen Prognose in humanen Kolonkarzinompräparaten. Hierbei zeigten Tumoren mit einer hohen Makrophagendichte in der Invasionsfront eine bessere Differenzierung, ein niedrigeres Tumorstadium, sowie eine geringere Anzahl an Lymphknotenmetastasen, was in einem längeren Überleben dieser Patienten resultierte. Allerdings untersuchten diese Studien nur die Makrophagendichte in sogenannten Hotspots entlang der Invasionsfront, nicht aber im Inneren des Tumors selbst^{40,41}. In den eigenen Versuchen zeigten sich hohe Makrophagendichten entlang der Invasionsfront sowohl in der Makrophagen-depletierten Gruppe, als auch in der Kontrollgruppe, wohingegen sich die Anzahl der Makrophagen im

Inneren der Tumoren und insbesondere in den Nekrosezonen unterschied, sodass eine alleinige Beurteilung der Makrophagendichte an der Invasionsfront im orthotopen Modell zu falschen Rückschlüssen geführt hätte.

Im Widerspruch zu diesen eben erwähnten Studien beschrieben andere Untersuchungen einen gegenteiligen Effekt von tumor-assoziierten Makrophagen auf das Kolonkarzinom. Bacman et al.⁴³ konnten zeigen, dass eine dichte Makrophageninfiltration im Tumor selbst und im Tumorstroma in einer großen Serie humaner Kolonkarzinompräparate mit einer schlechteren Differenzierung und einer höheren Rate an Lymphknotenmetastasen assoziiert war. Nichtsdestotrotz zeigten die Patienten mit einer geringeren Makrophagendichte kein signifikant längeres Überleben. In einer anderen Studie konnte ebenfalls anhand humaner Kolonkarzinompräparate gezeigt werden, dass die Makrophagendichte zwar nicht mit dem Tumorstadium korrelierte, jedoch eine hohe Dichte tumor-assoziiertes Makrophagen mit einer schlechteren Prognose einherging⁸¹. In einer weiteren Studie mit humanen Kolon- und Rektumkarzinompräparaten konnte beobachtet werden, dass Tumorzellen Makrophagen durch eine verstärkte Sekretion von MCP-1 in die Tumoren lockten und die daraus resultierenden hohen Makrophagendichten in diesen Präparaten mit fortgeschrittenen Tumorstadien korrelierten²⁶. In Untersuchungen an einem Xenograft-Modell, bei dem humane Kolonkarzinomzellen in Nacktmäuse implantiert wurden, zeigte sich ebenfalls, dass größere Tumoren eine höhere Makrophagendichte aufwiesen als kleinere Tumoren⁸¹.

Aharinejad et al.⁸² konnten in einem weiteren Kolonkarzinom-Xenograft-Modell beobachten, dass die Blockung der Expression des Makrophagen-Lockstoffes CSF-1 durch Gabe von Antisense-Oligonukleotiden in Mäusen zu einer geringeren Makrophageninfiltration in den Tumoren führte. Die niedrige Makrophagendichte wiederum bewirkte ein verlangsamtes Tumorwachstum und längeres Überleben der Tiere. Auch in einem Tiermodell einer chemisch induzierten Colitis konnten Bader et al.⁸³ beobachten, dass eine geringere Makrophagendichte durch Depletion zu einer signifikant geringeren Entwicklung von Tumoren und einer Hemmung des Tumorwachstums in Mäusen führte. Im Einklang mit diesen Forschungsergebnissen stellten Makrophagen auch in den eigenen Versuchen im orthotopen Kolonkarzinommodell einen wesentlichen Promotor für das Tumorwachstum dar, während die Makrophagendepletion zu einem deutlich verlangsamten Wachstum führte.

Verschiedene Einflüsse, die die wachstumsfördernde Wirkung von Makrophagen auf Tumorzellen erklären können, werden diskutiert. Es wurde beschrieben, dass Monozyten und undifferenzierte Makrophagen durch bestimmte Reize, wie z.B. MCP-1 oder CSF-1 in Tumoren gelockt werden und durch weitere, von Tumorzellen sezernierte Zytokine, wie zum Beispiel IL-4, IL-10 oder IL-13, zu tumor-assoziierten Makrophagen (M2) differenziert werden können^{19,23,26,82,84}. M2-Makrophagen produzieren nun ihrerseits wiederum Stoffe, die das Tumorstadium, die Angiogenese, sowie die Metastasierung fördern und für eine lokale Immunsuppression sorgen. Eine Stimulierung von undifferenzierten Makrophagen mit Lipopolysacchariden oder Interferon- γ hingegen bewirkte eine Differenzierung zu klassisch aktivierten Makrophagen (M1), die im Gegensatz zu tumor-assoziierten Makrophagen das Wachstum hemmten, indem sie unter anderem Sauerstoffradikale ausschütteten^{19,29}.

Speziell für das Kolonkarzinom wurden diese Mechanismen zum Teil auch bereits untersucht und beschrieben. Hierbei konnte zum einen gezeigt werden, dass M1-aktivierte Makrophagen durch Tumorzellen inhibiert wurden, sodass sie in der Folge die Produktion von Sauerstoffradikalen einstellten⁸⁵. Außerdem wurde beobachtet, dass M1-Makrophagen einen proliferationshemmenden Effekt auf Kolonkarzinomzellen ausübten, der bei M2-Makrophagen nicht beobachtet werden konnte⁸⁶. In Untersuchungen anhand humaner Kolonkarzinompräparate wurde herausgefunden, dass Makrophagen entlang der Invasionsfront der Tumoren sowohl zu einer erhöhten Apoptoserate, als auch zur Phagozytose der Kolonkarzinomzellen führten⁸⁷. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei Makrophagen entlang der Invasionsfront größtenteils um den M1-Phänotyp handeln dürfte, was gleichzeitig die oben bereits beschriebene bessere Prognose bei höherer Makrophagendichte entlang der Invasionsfront erklären könnte^{40,41}.

Zum anderen konnte beobachtet werden, dass der Lockstoff MCP-1 mit zunehmendem Tumorstadium durch Kolonkarzinomzellen exprimiert wurde und dadurch bedingt die Makrophagendichte mit dem Tumorstadium zunahm²⁶. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Kolonkarzinomzellen die Migration von M2-Makrophagen bewirkten und darüber hinaus die Zytokine IL-4 und IL-10 sezernierten, die bei der M2-Differenzierung von Makrophagen eine wichtige Rolle spielen^{81,85}. Im Gegenzug waren M2-differenzierte Makrophagen nun in der Lage, Faktoren wie EGF, FGF und HGF zu produzieren, die das Wachstum der Tumorzellen unterstützen^{88,89}. Ergebnisse bezüglich der Differenzierung der

Makrophagen in den Kolonkarzinomen des eigenen Versuches liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vor.

Dass die Wachstumsinhibition der Tumorzellen direkt durch die Gabe von Clodronat-Liposomen bewirkt wurde, konnte im durchgeführten Zytotoxizitätsassay und auch bereits durch andere wissenschaftlichen Arbeiten ausgeschlossen werden⁵⁴.

Bezüglich des Einflusses von Makrophagen auf die Neovaskularisierung konnten verschiedene Studien zeigen, dass Makrophagen zum einen in hypovaskularisierte Regionen von Tumoren gelockt wurden und zum anderen selbst in der Lage sind, Faktoren wie VEGF, PDGF oder bFGF auszuschütten, die die Gefäßneubildung anregen^{44,90-92}. Da Tumoren nur bis zu einer bestimmten Größe per Diffusion ernährt werden können, stellt die Neoangiogenese eine entscheidende Voraussetzung für das Tumorwachstum dar⁹³. Hinsichtlich des Einflusses von Makrophagen auf die Neoangiogenese beschrieben Barbera-Guillem et al.⁴⁴, dass tumor-assoziierte Makrophagen im Kolonkarzinom, wie auch in anderen Karzinomen, VEGF produzierten und dadurch direkt die Angiogenese förderten. Passend zu diesen Ergebnissen wiesen auch in den hier durchgeführten eigenen Versuchen die Tumoren aus der Kontrollgruppe eine höhere Gefäßdichte im Vergleich zur Makrophagen-depletierten Gruppe auf. In einer Studie anhand eines Peritonealkarzinose-Modells in der Ratte mit der Zelllinie CC531 zeigten Tiere, deren Makrophagen durch Clodronat-Injektionen depletiert worden waren, zwar eine höhere Tumorlast, jedoch war bei Tieren in der Kontrollgruppe eine höhere Gefäßdichte und schlechtere Differenzierung zu beobachten⁸⁹.

Die hohe Rate an Tieren mit einer Peritonealkarzinose in der eigenen Kontrollgruppe kann zum einen mit den fortgeschritteneren Tumorstadien in dieser Gruppe, zum anderen mit der, in anderen Publikationen beschriebenen Fähigkeit tumor-assoziiierter Makrophagen zur Produktion von verschiedenen, die Basalmembran und Extrazellulärmatrix abbauenden Enzymen erklärt werden, die das Herauslösen von Tumorzellen aus dem Tumor und die Migration in die Peritonealhöhle ermöglichen⁹⁴. In Studien konnte gezeigt werden, dass Makrophagen die Invasion, Motilität und Migration von Kolonkarzinomzellen steigerten, indem sie Matrixmetalloproteinasen und EGF sezernierten^{88,95}. Die hohe Zahl an Tieren in der Kontrollgruppe mit Lebermetastasen könnte ebenfalls mit den fortgeschrittenen

Tumorstadien, der hohen Gefäßdichte und einer möglicherweise erhöhten Tumordinfiltration der Gefäße durch eine verstärkte Sekretion von Matrix-abbauenden Enzymen durch Makrophagen erklärt werden. Außerdem könnte der im eigenen Lebermetastasenmodell nachgewiesene fördernde Effekt von Kupffer-Zellen auf die Metastasierung eine Rolle spielen⁹⁶.

Der Grund, warum auch in den Tumoren der depletierten Gruppe immer noch eine, wenn auch geringe Anzahl an Makrophagen in der Immunhistochemie nachgewiesen werden konnte, hängt mit der Verfügbarkeit der Clodronat-Liposomen zusammen. Die intraperitoneale Injektion der Liposomen führt zum Absterben nahezu aller, sich frei in der Peritonealhöhle befindlichen Makrophagen, sowie darüber hinaus aller Makrophagen in der Blutbahn, in die die Liposomen über den Lymphabfluss gelangen. Da Clodronat-Liposomen jedoch nicht in der Lage sind, Blutgefäße zu verlassen, konnten sie im Falle der orthotopen Tumoren nur das Einwandern neuer Makrophagen bzw. Monozyten aus der Blutbahn oder der Peritonealhöhle verhindern. Makrophagen, die sich zum Injektionszeitpunkt jedoch bereits in der Darmwand befanden, konnten nicht erreicht werden und dienen als Erklärung für die trotz Depletion vorhandenen Makrophagen in den Tumoren^{77,78,97}.

Bezüglich des Einflusses von Kupffer-Zellen auf die Entstehung von Lebermetastasen wurden bisher gegensätzliche Ergebnisse veröffentlicht. In dem für diese Arbeit verwendeten Lebermetastasenmodell zeigte sich eine signifikant geringere Metastasenanzahl in der Kupffer-Zell-depletierten Gruppe.

Dieser Befund steht im deutlichen Widerspruch zu den von Heuff et al.⁵⁴ und Bayon et al.⁵⁵ publizierten Arbeiten. Diese Veröffentlichungen beschrieben, dass die Makrophagen-Depletion in ihren Experimenten mit der Kolonkarzinomzelllinie CC531 in Ratten zu einer erhöhten Tumorlast in der Leber führte und erklärten diese Beobachtung mit der fehlenden zytotoxischen und phagozytierenden Aktivität durch Kupffer-Zellen, die in der ungehemmten Ausbildung von Metastasen resultierte.

Es gibt jedoch andere Arbeiten, die beschrieben, dass Kupffer-Zellen eher die Entstehung von Metastasen in der Leber fördern. Kupffer-Zellen befinden sich auf der Innenseite des Endothels innerhalb der Lebersinusoide und haben somit direkten Kontakt zu den im Blut zirkulierenden Tumorzellen⁴⁹. Mehrere Studien machten die Beobachtung, dass Kupffer-

Zellen fähig waren den Großteil der passierenden Tumorzellen zu binden und unmittelbar durch Sekretion zytotoxischer Substanzen oder per Phagozytose abzutöten^{49,56}. Gleichzeitig wurde ein kleinerer Anteil der Tumorzellen zwar gebunden, in der Folge jedoch nicht durch die Kupffer-Zellen phagozytiert, sodass diese Tumorzellen einen initialen Schritt zur Entstehung von Lebermetastasen darstellen könnten^{55,56,60}.

Ein weiterer wichtiger Schritt in der Ausbildung von Lebermetastasen könnte ebenfalls durch Kupffer-Zellen vermittelt werden. In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Glykoprotein CEA (Carcinoembryonales Antigen), welches sowohl von Kolonkarzinomzellen sezerniert, als auch auf ihrer Zelloberfläche exprimiert wurde, die Sekretion eines bestimmten Zytokin-Profiles durch Kupffer-Zellen induzierte. Die sezernierten Zytokine wiederum führten zur Expression von E-Selektin und ICAM-1 auf den Endothelzellen der zentrolobulären Lebersinusoiden und bewirkten hierüber die Adhäsion von Tumorzellen am Endothel, von wo die Entstehung von Metastasen ihren Ausgang nehmen könnte⁶¹⁻⁶³. Im Tierversuch konnten Khatib et al.⁹⁸ zeigen, dass die Inhibition der Expression von E-Selektin auf Endothelzellen zu einer reduzierten Anzahl an Lebermetastasen führte. In einem weiteren Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Blockade der für die Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel notwendigen CEA-Glykoproteine durch Gabe löslichen E-Selektins die Anzahl von Metastasen ebenfalls signifikant verminderte⁹⁹.

Kruskal et al.⁶³ beschrieben, dass die Kupffer-Zell-vermittelte Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel ein tumorzellspezifischer Mechanismus sei, da in ihren Experimenten CEA-exprimierende und -sezernierende Tumorzellen die E-Selektin-Expression auf Endothelzellen über die Aktivierung von Kupffer-Zellen induzierten, wohingegen nicht-CEA-produzierende Kolonkarzinomzellen zu keiner verstärkten Expression von E-Selektin auf dem Endothel und somit auch zu keiner erhöhten Tumorzelladhäsion führten. Kan et al.¹⁰⁰ untersuchten das Adhäsionsverhalten von Tumorzellen der Zelllinie CT-26, die auch in den Experimenten der eigenen Arbeit eingesetzt wurde, in den Lebersinusoiden. Sie stellten fest, dass die Tumorzellen am häufigsten an Endothelzellen in den zentrolobulären Abschnitten der Lebersinusoiden adhärirten, also den Bereichen, in denen Kruskal et al.⁶³ auch die Hochregulation der E-Selektin-Expression beschrieben hatten.

Bisher wurde nur in wenigen Studien die Auswirkung der Kupffer-Zell-Depletion auf die Lebermetastasierung des Kolonkarzinoms untersucht. In den beiden eingangs erwähnten Publikationen wurde den Kupffer-Zellen eine Metastasen-verhindernde Wirkung zugeschrieben. Ratten in der Kupffer-Zell-depletierten Gruppe zeigten hier eine signifikant höhere Metastasenanzahl in der Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Experimente wurden jedoch in beiden Studien mit derselben Zelllinie (CC531) durchgeführt^{54,55}. Da die Adhäsion von Tumorzellen und damit die frühen Schritte in der Entstehung von Lebermetastasen wie oben beschrieben extrem Tumorzell-spezifisch zu sein scheinen, ist es möglicherweise sinnvoll, weitere Untersuchungen mit anderen Zelllinien zu unternehmen, um den Einfluss von Kupffer-Zellen auf die Ausbildung von Lebermetastasen weiter zu erforschen.

Bezüglich der Korrelation zwischen der Kupffer-Zelldichte und der Metastasenanzahl in der Leber haben andere Studien bereits nachgewiesen, dass die Anzahl der Kupffer-Zellen mit zunehmender Tumorlast in der Leber zunahm^{56,100}. Da in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen die Kupffer-Zelldichte erst zwei Wochen nach der Injektion der Tumorzellen in die Milz bestimmt wurde, kann nicht geschlussfolgert werden, ob die Metastasenanzahl direkt mit der Kupffer-Zelldichte, oder umgekehrt eher die Kupffer-Zelldichte mit der Metastasenanzahl korreliert.

Dass sich die Metastasen zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant in ihrer Größe unterscheiden kann damit zusammenhängen, dass sich auch hinsichtlich der Makrophagendichte innerhalb der Lebermetastasen keine signifikanten Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen fanden. Es bleibt also die Frage offen, ob Makrophagen im hier verwendeten Lebermetastasenmodell der Maus in bereits vorhandenen Lebermetastasen einen tumor-unterstützenden Einfluss, wie beim primären murinen Kolonkarzinom, haben oder nicht. Der Grund für die auch in der depletierten Gruppe vorhandenen Makrophagen innerhalb der Lebermetastasen liegt vermutlich, wie bereits oben beschrieben, an der Verfügbarkeit der Liposomen und ihrer Unfähigkeit, außerhalb der Blutbahn befindliche Makrophagen zu erreichen^{77,78}.

Die Lokalisation der Metastasen in der Leber betreffend berichteten Timmers et al.⁵⁶, dass in der Ratte die Tumorzellen, die nicht von Kupffer-Zellen gebunden und phagozytiert wurden und somit den Ausgangspunkt für die Metastasierung darstellen könnten, sich größtenteils

in einem Bereich von bis zu 250µm unterhalb der Glisson-Kapsel befanden. Griffini et al.¹⁰¹ beschrieben, dass sich drei Wochen nach Injektion von CC531-Kolonkarzinomzellen in Ratten, die Metastasen in erster Linie direkt unterhalb der Leberoberfläche befanden und nur ein geringer Anteil zentral in der Leber lokalisiert war. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in den für die hier vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten gemacht werden. In allen drei Gruppen zeigten sich ähnliche exponentielle Verteilungsmuster der Metastasen, mit der Lokalisation des Großteils der Metastasen unmittelbar an der Leberoberfläche. Da dieses Verteilungsmuster auch in der Kupffer-Zell-depletierten Gruppe, hier allerdings mit einer niedrigeren Gesamtzahl an Metastasen, vorzufinden war, scheint die Präferenz zur Metastasierung in den oberflächennahen Leberbereichen Kupffer-Zell-unabhängig zu sein. Dennoch scheint das Vorhandensein von Kupffer-Zellen die Ausbildung von Metastasen in dieser Region zu potenzieren.

Einen möglichen Kupffer-Zell-unabhängigen Mechanismus, der hierbei einen initialen Schritt in der Ausbildung von Lebermetastasen darstellen könnte, stellt die mechanische Obstruktion der Lebersinusoide durch zirkulierende Tumorzellen dar¹⁰².

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Verbesserung der Darstellbarkeit des Darmes der Maus im MRT. Bei der Bestimmung der Lebermetastasenanzahl erwies sich das MRT als hilfreich und leicht durchführbar. Die Metastasenanzahl konnte so genauer bestimmt werden, als lediglich durch Auszählen der Metastasen auf der Leberoberfläche oder durch Bestimmung des Lebergewichtes. Die Bildgebung der Tumoren im orthotopen Kolonkarzinommodell stellte sich hingegen zunächst als schwierig dar. Aufgrund der starken Darmperistaltik und den unter diesen Bedingungen ungünstigen langen Messzeiten in den verwendeten T2-gewichteten Sequenzen, gestaltete es sich insbesondere schwierig, kleinere Tumoren sicher zu detektieren.

Durch die beiden in dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Bildgebung des gesamten Dickdarmes unter Verwendung von einem Einlauf mit Buscopan, der transrektalen bzw. intravenösen Kontrastmittel-Applikation sowie T1-gewichteter, hochauflösender Vibe-Sequenzen, gelang es nun, den Darm der Maus sicher, wenig invasiv, zuverlässig und reproduzierbar darzustellen.

Mausmodelle zur Entstehung kolorektaler Karzinome stehen in zunehmender Anzahl zur Verfügung¹⁰³. Um die Karzinogenese im Verlauf untersuchen zu können und den Einfluss verschiedener Therapeutika im Zeitverlauf testen zu können, war es bisher oft nötig, die Tiere zu bestimmten Zeitpunkten während des Experimentes zu töten. Bildgebende Verfahren, wie zum Beispiel das MRT, können hier zum einen helfen, die Anzahl der benötigten Versuchstiere zu reduzieren, zum anderen können sie zu einem Informationsgewinn beitragen, indem sie beispielsweise die Beobachtung der Tumorentstehung im Zeitstrahl oder die Durchblutung eines Tumors *in vivo* ermöglichen¹⁰⁴. Zusätzlich könnten Therapieeffekte frühzeitig erfasst werden.

Beim Menschen stellt die Koloskopie mit gleichzeitiger Biopsieentnahme das Standardverfahren zur Diagnosesicherung des Kolonkarzinoms dar^{3,9}. Auch in der Maus besteht die Möglichkeit, das Kolon endoskopisch zu untersuchen. Hierbei können ebenfalls hochauflösende Bilder erzeugt und Biopsien entnommen werden. Jedoch ist die Untersuchung aufwendig und birgt, wie auch im Menschen, das Risiko der Perforation sowie der Blutung und ermöglicht in der Maus lediglich die Beurteilung der distalen drei bis vier Zentimeter des Kolons^{73,105}. Weitere Informationen, wie zum Beispiel über die Darmwanddicke im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen oder die Ausbildung von Metastasen, können nicht gewonnen werden. Da die Kolonkarzinome im verwendeten orthotopen Modell am Caecum wuchsen, wären sie endoskopisch nicht erreichbar gewesen und aufgrund der subserösen Implantationstechnik nicht sicher vom Lumen aus beurteilbar gewesen.

Neben der Endoskopie wird mittlerweile auch der Ultraschall in Kleintiermodellen verwendet¹⁰⁶. Seguin et al.¹⁰⁷ konnten in einem ähnlichen wie dem hier vorliegenden orthotopen Kolonkarzinommodell, und darüber hinaus in einem ektopen Modell, zeigen, dass sich die Sonographie zur Bildgebung des Kolonkarzinoms in der Maus prinzipiell eignet. Jedoch zeigten sich Einschränkungen bei der Tumorummetrie, eine niedrige Auflösung sowie luftbedingte Artefakte.

Auch die Computertomographie (CT) stellt eine Möglichkeit zur Bildgebung des Kolonkarzinoms dar. Im Tiermodell zeigte sich eine gute Auflösung bei kurzen Untersuchungszeiten^{108,109}. Ein wesentlicher Kritikpunkt besteht jedoch in der Exposition

gegenüber ionisierender Strahlung, deren Einfluss auf die Tumorbilogie sowie auf das Immunsystem im Tiermodell nicht abgeschätzt werden kann^{71,110}.

Im Gegensatz hierzu stellt das MRT eine strahlungsfreie Untersuchungsmethode dar, die darüber hinaus einen guten Weichteilkontrast und eine hohe Auflösung von 50-100µm bietet. Außerdem erlaubt sie die Anfertigung von Bildern in jeder Ebene des Raumes⁷¹. Die Bildgebung des Darmes stellte sich jedoch in der vorliegenden Arbeit zunächst als schwierig dar. Im orthotopen Kolonkarzinommodell erschwerten sowohl die Darmperistaltik, als auch Bewegungsartefakte, bedingt durch den Herzschlag und die Atmung, die Bildgebung im MRT. Obwohl die Bewegungsartefakte durch eine atemgetriggerte Messung auf ein Minimum reduziert werden konnten, stellte die Darmperistaltik bei einer einzelnen Sequenzlänge von 12-15min in der T2-Wichtung eine starke Beeinträchtigung bei der Untersuchung dar, die durch die intravenöse Gabe von Buscopan nicht ausreichend gehemmt werden konnte. Erst wenn die Tumoren eine gewisse Größe erreicht hatten wurde die Peristaltik gehemmt, was dann eine sichere Detektion möglich machte.

In einem ähnlichen Kolonkarzinommodell mit der gleichen Zelllinie und dem gleichen Mausstamm beschrieben Seguin et al.¹⁰⁷ keine Schwierigkeiten bei der MRT-Bildgebung mittels ebenfalls T2-gewichteter Sequenzen. Allerdings erreichten Tumoren in ihrem Modell deutlich größere Volumina und erleichterten dadurch die Detektion und Volumetrie.

In mehreren Studien zur MRT-Bildgebung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Mausmodell wurden zur Beurteilung der Wanddicke, der Entzündungsaktivität und der Ausbildung von Tumoren die distalen drei bis vier Zentimeter des Kolons untersucht. Aufgrund der anatomischen Fixierung des Rektums im kleinen Becken ist dieser Bereich jedoch weniger anfällig für Bewegungsartefakte als beispielweise das Caecum¹¹¹⁻¹¹³. Ericsson et al.⁷² schilderten, dass in ihrem Mausmodell eines muzinösen Adenokarzinoms des Kolons, Bewegungsartefakte hingegen ebenfalls eine Hürde bei der Erzeugung T1- und T2-gewichteter Sequenzen darstellten. Lediglich 58% der histologisch erkennbaren Tumoren waren auch schon vorher im MRT aufgefallen. Nur bei einem von zwölf Tieren konnten sämtliche Läsionen bei allen sieben MRT-Messungen im Zeitverlauf dargestellt werden.

In eigenen Versuchen mit dem Ziel, die Peristaltik weiter zu hemmen, zeigte sich die Insufflation von Luft, wie sie im Menschen im Rahmen der MR-Kolonographie bereits erfolgreich angewendet wurde, als wenig erfolgversprechend^{114,115}. Die Peristaltik wurde

eher noch weiter angeregt und die Luft führte zu weiteren Artefakten in der T2-Wichtung. Auch die Applikation von reiner Kochsalzlösung ohne Kontrastmittel in den Darm stellte sich als nicht wirksam heraus. Zwar war die Darmperistaltik nun reduziert, doch kam es aufgrund der langen Messzeiten bei der T2-Wichtung weiterhin zu Artefakten.

Erst die Gabe von Kontrastmittel sowie eines Einlaufes mit Buscopan unter Verwendung der zeitlich kürzeren T1-Vibe-Sequenzen brachte eine deutliche Steigerung der Bildqualität. Die Methoden ermöglichten eine zuverlässig reproduzierbare Bildgebung des Dickdarmes sowie großer Teile des Dünndarmes und stellten sich als schonend für die Tiere heraus. In einer Vielzahl verschiedener Tiermodelle entwickeln die Mäuse nicht nur Tumoren in den distalen Abschnitten des Kolons, die bisher relativ problemlos im MRT untersucht werden können, sondern auch in weiter oral liegenden Darmabschnitten bis hin zum Dünndarm^{103,108}. Hierbei könnten die beschriebenen Untersuchungsmethoden eine Möglichkeit darstellen, die Tumorentstehung im Zeitverlauf zu visualisieren und unter der Gabe verschiedener Therapeutika zu beobachten. Saar et al.¹¹⁶ beschrieben, dass ein ähnliches Verfahren bereits erfolgreich im Menschen angewendet wurde, mit dem Unterschied, dass Buscopan hier intravenös verabreicht wurde. Bei hoher Sicherheit und geringer Invasivität stellte es hierbei ein sensitives Verfahren zur Detektion von Kolonkarzinomen, Polypen oder Adenomen dar. Schwierigkeiten bestanden jedoch in der Detektion kleinerer Adenome und Polypen mit einer Größe von weniger als 5mm, sowie teilweise bei der Unterscheidung zwischen Darmwandläsionen bzw. Stuhl oder Luftblasen. In weiteren Versuchen müsste anhand von Tiermodellen zum Kolonkarzinom bzw. zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die Sensitivität und Spezifität der beiden entwickelten Methoden zur Bildgebung bei der Detektion von pathologischen Läsionen beurteilt werden. Hierbei dürfte sich die Methode der transrektalen Kontrastmittelapplikation insbesondere bei der Bildgebung von intraluminal wachsenden Tumoren oder aber bei der Suche nach Darmstenosen als hilfreich erweisen. Die intravenöse Anwendung von Kontrastmittel könnte zur Beurteilung von pathologischen Veränderungen der Darmwand wie zum Beispiel von Tumoren oder entzündlichen Veränderungen verwendet werden.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen sprechen dafür, dass tumor-assoziierte Makrophagen im Kolonkarzinom, wie auch in anderen Tumorentitäten eine tumor-

unterstützende Wirkung haben, indem sie das Tumorwachstum, die Neoangiogenese, sowie die Metastasierung signifikant steigern. Die hier gezeigten Ergebnisse könnten unter Berücksichtigung bereits vorliegender Erkenntnisse einen Beitrag für die Entwicklung zukünftiger Therapien des Kolonkarzinoms darstellen. Eine gezielte Depletion von bestimmten Makrophagenpopulationen, wie zum Beispiel der tumor-assoziierten Makrophagen im Tumor selbst, oder aber der Kupffer-Zellen in der Leber, könnten das Tumorwachstum entscheidend inhibieren oder eine Metastasierung in die Leber verhindern. Alternativ könnten Versuche vorgenommen werden, sich die Eigenschaften von Makrophagen gezielt zu Nutze zu machen, indem beispielsweise tumor-assoziierte (M2) Makrophagen mittels geeigneter Stimuli in proinflammatorische (M1) Makrophagen umdifferenziert werden, die nun durch Antigen-Präsentation, Ausschüttung zytotoxischer Substanzen oder per Phagozytose verstärkt Tumor-supprimierend oder direkt Tumorzytotoxisch wirken.

Um den Einfluss tumor-assoziiierter Makrophagen und Kupffer-Zellen auf das Kolonkarzinom und die hieran beteiligten Mechanismen noch besser zu verstehen, sollten weitere Untersuchungen unternommen werden, um hieraus möglicherweise für den Menschen anwendbare Therapiemöglichkeiten ableiten zu können.

Die neu etablierten MRT-Untersuchungsmethoden des Darmes könnten in einer Vielzahl verschiedener Tiermodelle zur Anwendung kommen und den Informationsgewinn hier erheblich steigern. Beispielsweise könnte in Tiermodellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen die Karzinogenese unter verschiedenen Bedingungen und Therapieansätzen über die Zeit beobachtet werden. Das MRT erlaubt hierbei eine nicht-invasive, longitudinale Verlaufsbeurteilung bei gleichzeitiger Reduktion der Anzahl von Versuchstieren. In weiteren Versuchen müsste nun die Sensitivität und Spezifität der beiden beschriebenen Methoden bei der Beurteilung pathologischer Läsionen des Darmes untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Makrophagen stellen einen wesentlichen Bestandteil des leukozytären Infiltrates des Kolonkarzinoms und anderer maligner Tumoren dar. Für eine Reihe anderer Tumorentitäten konnte bereits nachgewiesen werden, dass tumor-assoziierte Makrophagen das Wachstum, die Neoangiogenese und die Metastasierung fördern. Bisherige Studien zur Rolle der Makrophagen im Kolonkarzinom zeigten hingegen widersprüchliche Ergebnisse.

Um den Einfluss von Makrophagen auf das Wachstums- und Metastasierungsverhalten im Kolonkarzinom genauer zu untersuchen, wurde zum einen ein orthotopes, syngenes Kolonkarzinommodell, zum anderen ein Lebermetastasenmodell unter Verwendung der murinen Kolonkarzinomzelllinie CT-26 in der immunkompetenten Balb/c-Maus verwendet und die Makrophagen bzw. Kupffer-Zellen mittels intraperitonealer Injektion von Clodronat-Liposomen selektiv depletiert. Die Tumolvolumina bzw. die Metastasenanzahl wurden mittels 7-Tesla Kleintier-MRT bestimmt und das Tumorgewicht per Feinwaage ermittelt. Die Makrophagen- und Gefäßdichte in den orthotopen Tumoren sowie die Kupffer-Zelldichte im Lebermetastasenmodell wurden mit Hilfe der Immunhistochemie ausgewertet.

Die Makrophagendepletion führte zu einer signifikanten Verringerung des Tumorwachstums im orthotopen Kolonkarzinommodell und verminderte hier gleichzeitig die Anzahl an Tieren, die eine Peritonealkarzinose bzw. Lebermetastasen entwickelten. Darüber hinaus führte die Depletion zu einer signifikanten Hemmung der Neoangiogenese im Kolonkarzinom. Im Lebermetastasenmodell führte die Kupffer-Zelldepletion zu einer signifikant geringeren Anzahl an Lebermetastasen, wobei die Kupffer-Zelldichte direkt mit der Metastasenanzahl korrelierte.

Die Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass tumor-assoziierte Makrophagen im Kolonkarzinom, wie auch in einigen anderen malignen Erkrankungen, eine tumor-unterstützende Rolle ausüben. Darüber hinaus scheinen Kupffer-Zellen einen entscheidenden Promotor bei der Ausbildung von Lebermetastasen darzustellen.

Zukünftige Therapien könnten darauf abzielen, selektiv bestimmte Makrophagenpopulationen wie die tumor-assoziierten Makrophagen oder Kupffer-Zellen zu depletieren. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Umdifferenzierung von tumor-assoziierten Makrophagen (M2) in proinflammatorische Makrophagen (M1), die dann suppressiv oder zytotoxisch auf den Tumor wirken.

Des Weiteren wurden zwei Untersuchungsmethoden zur Darmbildgebung in der Maus mittels MRT entwickelt, die eine deutliche Steigerung der Bildqualität und einen zusätzlichen Informationsgewinn in Tierversuchen ermöglichen. Beide Untersuchungstechniken erwiesen sich als gut reproduzierbar und erlauben eine longitudinale Beurteilung von Darmerkrankungen über einen längeren Zeitraum.

In weiteren Versuchen müsste nun die Sensitivität und Spezifität der beiden beschriebenen Methoden bei der Untersuchung pathologischer Läsionen des Darmes beurteilt werden.

Literaturverzeichnis

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics , 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2017; 67(1):7–30.
2. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. <http://www.rki.de> 2016; 274.
3. Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365:153–65.
4. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes and Control* 2013; 24(6):1207–22.
5. Lynch JP, Hoops TC. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2002; 16(4):775–810.
6. Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: Hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *British Medical Bulletin* 2002; 64:27–43.
7. Schumpelick V, Bleese N, Mommsen U. *Chirurgie*. Thieme-Verlag, Stuttgart, 6. Auflage 2004.
8. Keller R, Bruch HP, Czymek R. Kolonkarzinom. *Allgemein- und Viszeralchirurgie* up2date 2008; 2(6):407–30.
9. Pox C, Aretz S, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heußner P, Hohenberger W, Holstege A, Hübner J, Kolligs F, Kreis M, Lux P, Ockenga J, Porschen R, Post S, Rahner N, Reinacher-Schick A, Riemann JF, Sauer R, Sieg A, Scheppach W, Schmitt W, Schmoll HJ, Schulmann K, Tannapfel A, Schmiegel W. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0 - Juni 2013 AWMF-Registernummer: 021/007OL. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2013; 51(8):753–854.
10. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, Balladur P, Boudjema K, Bachellier P, Jaeck D. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver: A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. *Cancer* 1996; 77(7):1254–62.
11. Fong Y, Cohen AM, Fortner JG, Enker WE, Turnbull AD, Coit DG, Marrero AM, Prasad M, Blumgart LH, Brennan MF. Liver resection for colorectal metastases. *Journal of Clinical Oncology* 1997; 15(3):938–46.
12. Kato T, Yasui K, Hirai T, Kanemitsu Y, Mori T, Sugihara K, Mochizuki H, Yamamoto J. Therapeutic results for hepatic metastasis of colorectal cancer with special reference to effectiveness of hepatectomy: analysis of prognostic factors for 763 cases recorded at 18 institutions. *Diseases of the Colon and Rectum* 2003; 46:22-31.
13. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Annals of Surgery* 2006; 244(2):254-259.
14. Mayo SC, Pawlik TM. Current management of colorectal hepatic metastasis. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology* 2009; 3(2):131–44.
15. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology Today* 1992; 13(7):265–70.
16. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow. *Lancet* 2001; 357:539–45.
17. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420:860–7.

18. Schuett C, Broeker B. Grundwissen Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage 2011.
19. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer* 2006; 42(6):717–27.
20. Goerdt S, Orfanos CE. Other functions, other genes: Alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 1999; 10:137–42.
21. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2008; 66(1):1–9.
22. Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 2006; 211(6–8):487–501.
23. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 2004; 25(12):677–86.
24. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 2002; 23(11):549–55.
25. Graves DT, Jiang YL, Williamson MJ, Valente AJ. Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells. *Science* 1989; 245:1490–3.
26. Bailey C, Negus R, Morris A, Ziprin P, Goldin R, Allavena P, Peck D, Darzi A. Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clinical and Experimental Metastasis* 2007; 24(2):121–30.
27. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4(1):71–78.
28. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research* 2006; 66(2):605–12.
29. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: Implications for new anticancer therapies. *The Journal of Pathology* 2002; 196(3):254–65.
30. Kono Y, Kawakami S, Higuchi Y, Yamashita F, Hashida M. In vitro evaluation of inhibitory effect of nuclear factor-kappaB activity by small interfering RNA on pro-tumor characteristics of M2-like macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2014; 37(1):137–44.
31. Partecke LI, Günther C, Hagemann S, Jacobi C, Merkel M, Sandler M, van Rooijen N, Käding A, Nguyen Trung D, Lorenz E, Diedrich S, Weiss FU, Heidecke CD, von Bernstorff W. Induction of M2-macrophages by tumour cells and tumour growth promotion by M2-macrophages: A quid pro quo in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2013; 13(5):508–16.
32. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Research* 1996; 56(20):4625–4629.
33. Lee a H, Happerfield LC, Bobrow LG, Millis RR. Angiogenesis and inflammation in

- invasive carcinoma of the breast. *Journal of Clinical Pathology* 1997;50(8):669-673.
34. Hanada T, Nakagawa M, Emoto A, Nomura T, Nasu N, Nomura Y. Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *International Journal of Urology* 2000; 7(7):263–9.
 35. Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, Damber JE, Egevad L, Bergh A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *International Journal of Oncology* 2000; 17(3):445–51.
 36. Yeung OW, Lo CM, Ling CC, Qi X, Geng W, Li CX, Ng KT, Forbes SJ, Guan XY, Poon RT, Fan ST, Man K. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 2015; 62(3):607–16.
 37. Yang J, Li X, Liu XP, Liu Y. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015; 8(6):6656-64.
 38. Ohno S, Inagawa H, Dhar DK, Fujii T, Ueda S, Tachibana M, Suzuki N, Inoue M, Soma G, Nagasue N. The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients. *Anticancer Research* 2003; 23(6D):5015–22.
 39. Kerr KM, Johnson SK, King G, Kennedy MM, Weir J, Jeffrey R. Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? *Histopathology* 1998; 33(1):55–63.
 40. Zhou Q, Peng RQ, Wu XJ, Xia Q, Hou JH, Ding Y, Zhou QM, Zhang X, Pang ZZ, Wan DS, Zeng YX, Zhang XS. The density of macrophages in the invasive front is inversely correlated to liver metastasis in colon cancer. *Journal of Translational Medicine* 2010; 8:13.
 41. Forssell J, Öberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clinical Cancer Research* 2007; 13(5):1472–9.
 42. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutegard J, Öberg A, Oldenborg PA, Palmqvist R. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS One* 2012; 7(10):e47045.
 43. Bacman D, Merkel S, Croner R, Papadopoulos T, Brueckl W, Dimmler A. TGF-beta receptor 2 downregulation in tumour-associated stroma worsens prognosis and high-grade tumours show more tumour-associated macrophages and lower TGF-beta1 expression in colon carcinoma: a retrospective study. *BMC Cancer* 2007; 7(7):156.
 44. Barbera-Guillem E, Nyhus JK, Wolford CC, Friece CR, Sampsel JW. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Research* 2002; 62(23):7042–9.
 45. Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 1992;46(1-3):155–68.
 46. Laskin D. Nonparenchymal Cells and Hepatotoxicity. *Seminars in Liver Disease* 1990; 10(4):293–304.
 47. Paschos KA, Majeed AW, Bird NC. Role of Kupffer cells in the outgrowth of colorectal cancer liver metastases. *Hepatology Research* 2010; 40(1):83–94.
 48. van der Bij GJ, Oosterling SJ, Meijer S, Beelen RH, van Egmond M. Therapeutic potential of Kupffer cells in prevention of liver metastases outgrowth. *Immunobiology*

- 2005; 210(2–4):259–65.
49. Braet F, Nagatsuma K, Saito M, Soon L, Wisse E, Matsuura T. The hepatic sinusoidal endothelial lining and colorectal liver metastases. *World Journal of Gastroenterology* 2007; 13(6):821–5.
 50. van Den Eynden GG, Majeed AW, Illemann M, Vermeulen PB, Bird NC, Høyer-Hansen G, Eefsen RL, Reynolds AR, Brodt P. The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: Biology and clinical implications. *Cancer Research* 2013; 73(7):2031–43.
 51. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver International* 2006; 26(10):1175–86.
 52. Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl. 1):54–62.
 53. Roberts RA, Ganey PE, Ju C, Kamendulis LM, Rusyn I, Klaunig JE. Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicological Sciences* 2007; 96(1):2–15.
 54. Heuff G, Oldenburg HS, Boutkan H, Visser JJ, Beelen RH, van Rooijen N, Dijkstra CD, Meyer S. Enhanced tumour growth in the rat liver after selective elimination of Kupffer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 1993; 37(2):125–30.
 55. Bayón LG, Izquierdo MA, Sirovich I, van Rooijen N, Beelen RH, Meijer S. Role of Kupffer cells in arresting circulating tumor cells and controlling metastatic growth in the liver. *Hepatology* 1996; 23(5):1224–31.
 56. Timmers M, Vekemans K, Vermijlen D, Asosingh K, Kuppen P, Bouwens L, Wisse E, Braet F. Interactions between rat colon carcinoma cells and Kupffer cells during the onset of hepatic metastasis. *International Journal of Cancer* 2004; 112(5):793–802.
 57. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2002; 44(2):143–61.
 58. Kimura Y, Inoue A, Hangai S, Saijo S, Negishi H, Nishio J, Yamasaki S, Iwakura Y, Yanai H, Taniguchi T. The innate immune receptor Dectin-2 mediates the phagocytosis of cancer cells by Kupffer cells for the suppression of liver metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016; 113(49):14097–102.
 59. Matsumura H, Kondo T, Ogawa K, Tamura T, Fukunaga K, Murata S, Ohkohchi N. Kupffer cells decrease metastasis of colon cancer cells to the liver in the early stage. *International Journal of Oncology* 2014; 45(6):2303–10.
 60. Gjøen T, Seljelid R, Kolset SO. Binding of metastatic colon carcinoma cells to liver macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 1989; 45(4):362–369.
 61. Gangopadhyay A, Lazure DA, Thomas P. Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells. *Clinical and Experimental Metastasis* 1998; 16(8):703–12.
 62. Aarons CB, Bajenova O, Andrews C, Heydrick S, Bushell KN, Reed KL, Thomas P, Becker JM, Stucchi AF. Carcinoembryonic antigen-stimulated THP-1 macrophages activate endothelial cells and increase cell-cell adhesion of colorectal cancer cells. *Clinical and Experimental Metastasis* 2007; 24(3):201–9.
 63. Kruskal JB, Azouz A, Korideck H, El-Hallak M, Robson SC, Thomas P, Goldberg SN. Hepatic colorectal cancer metastases: imaging initial steps of formation in mice.

- Radiology 2007; 243(3):703–11.
64. Walsh JME, Terdiman JP. Colorectal cancer screening: clinical applications. *JAMA* 2003; 289(10):1297–302.
 65. Huppertz A, Balzer T, Blakeborough A, Breuer J, Giovagnoni A, Heinz-Peer G, Laniado M, Manfredi RM, Mathieu DG, Mueller D, Reimer P, Robinson PJ, Strotzer M, Taupitz M, Vogl TJ. Improved detection of focal liver lesions at MR imaging: multicenter comparison of gadoxetic acid-enhanced MR images with intraoperative findings. *Radiology* 2004; 230(1):266–75.
 66. Stroszczynski C, Gaffke G, Gnauck M, Streitparth F, Wieners G, Lopez-Häninnen E. Aktueller Stand der MRT- Diagnostik mit leberspezifischen Kontrastmitteln. *Der Radiologe* 2004; 44(12):1185–91.
 67. Scharitzer M, Ba-Ssalamah A, Ringl H, Kölblinger C, Grünberger T, Weber M, Schima W. Preoperative evaluation of colorectal liver metastases: Comparison between gadoxetic acid-enhanced 3.0-T MRI and contrast-enhanced MDCT with histopathological correlation. *European Radiology* 2013; 23(8):2187–96.
 68. Epstein FH. MR in mouse models of cardiac disease. *NMR in Biomedicine* 2007; 20(3):238–55.
 69. Price AN, Cheung KK, Cleary JO, Campbell AE, Riegler J, Lythgoe MF. Cardiovascular magnetic resonance imaging in experimental models. *The Open Cardiovascular Medicine Journal* 2010; 4:278–92.
 70. Anderson SA, Frank JA. MRI of mouse models of neurological disorders. *NMR in Biomedicine* 2007; 20(3):200–15.
 71. Jelicks LA. Imaging the gastrointestinal tract of small animals. *Journal of Neuroparasitology* 2010; 1:1–6.
 72. Ericsson AC, Myles M, Davis W, Ma L, Lewis M, Maggio-Price L, Franklin C. Noninvasive detection of inflammation-associated colon cancer in a mouse model. *Neoplasia* 2010; 12(12):1054–65.
 73. Becker C, Fantini MC, Neurath MF. High resolution colonoscopy in live mice. *Nature Protocols* 2006; 1(6):2900–4.
 74. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Methuen, London 1959, 69-154
 75. Corbett TH, Griswold DP, Roberts BJ, Peckham JC, Schabel FM. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Research* 1975; 35(9):2434–9.
 76. Brattain M, Strobel-Stevens J, Fine D, Webb M, Sarrif AM. Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Research* 1980; 40(7):2142–6.
 77. van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *Journal of Immunological Methods* 1994; 174(1–2):83–93.
 78. van Rooijen N, Hendrikx E. Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues. *Methods in Molecular Biology* 2010; 605:189–203.
 79. van Rooijen N, Sanders A. Kupffer cell depletion by liposome-delivered drugs: Comparative activity of intracellular clodronate, propamidine, and ethylenediaminetetraacetic acid. *Hepatology* 1996; 23(5):1239–43.

80. Salvesen HB, Akslen LA. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *International Journal of Cancer* 1999; 84(5):538–43.
81. Zhang Y, Sime W, Juhas M, Sjölander A. Crosstalk between colon cancer cells and macrophages via inflammatory mediators and CD47 promotes tumour cell migration. *European Journal of Cancer* 2013; 49(15):3320–34.
82. Aharinejad S, Paulus P, Sioud M, Hofmann M, Zins K, Schäfer R, Stanley ER, Abraham D. Colony-stimulating factor-1 blockade by antisense oligonucleotides and small interfering RNAs suppresses growth of human mammary tumor xenografts in mice. *Cancer Research* 2004; 64(15):5378–84.
83. Bader JE, Enos RT, Velazquez KT, Carson MS, Nagarkatti M, Nagarkatti PS, Chatzistamou I, Davis JM, Carson JA, Robinson CM, Murphy EA. Macrophage depletion using clodronate liposomes decreases tumorigenesis and alters gut microbiota in the AOM/DSS mouse model of colon cancer. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2018; 314(1):G22-G31
84. Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Indera H, Matsushima K. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clinical Cancer Research* 2000; 6(8):3282–9.
85. Siegert A, Denkert C, Leclere A, Hauptmann S. Suppression of the reactive oxygen intermediates production of human macrophages by colorectal adenocarcinoma cell lines. *Immunology* 1999; 98(4):551–6.
86. Engström A, Erlandsson A, Delbro D, Wijkander J. Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2. *International Journal of Oncology* 2014; 44(2):385–92.
87. Sugita J, Ohtani H, Mizoi T, Saito K, Shiiba K, Sasaki I, Matsuno S, Yagita H, Miyazawa M, Nagura H. Close association between Fas ligand (FasL; CD95L)-positive tumor-associated macrophages and apoptotic cancer cells along invasive margin of colorectal carcinoma: a proposal on tumor-host interactions. *Japanese Journal of Cancer Research* 2002; 93(3):320–8.
88. Cardoso AP, Pinto ML, Pinto AT, Oliveira MI, Pinto MT, Goncalves R, Relvas JB, Figueiredo C, Seruca R, Mantovani A, Mareel M, Barbosa MA, Oliveira MJ. Macrophages stimulate gastric and colorectal cancer invasion through EGFR Y(1086), c-Src, Erk1/2 and Akt phosphorylation and smallGTPase activity. *Oncogene* 2014; 33(16):2123–33.
89. Oosterling SJ, van der Bij GJ, Meijer GA, Tuk CW, van Garderen E, van Rooijen N, Meijer S, van der Sijp JR, Beelen RH, van Egmond M. Macrophages direct tumour histology and clinical outcome in a colon cancer model. *The Journal of Pathology* 2005; 207(2):147–55.
90. Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: The relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncology Reports* 2005; 14(2):425–31.
91. Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjällman AH, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated

- macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *British Journal of Cancer* 2006; 95(3):272–81.
92. Jedinak A, Dudhgaonkar S, Sliva D. Activated macrophages induce metastatic behavior of colon cancer cells. *Immunobiology* 2010; 215(3):242–9.
 93. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 1971; 285(21):1182–6.
 94. Illemann M, Bird N, Majeed A, Sehested M, Laerum OD, Lund LR, Danø K, Nielsen BS. MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Molecular Cancer Research* 2006; 4(5):293–302.
 95. Vinnakota K, Zhang Y, Selvanesan BC, Topi G, Salim T, Sand-Dejmek J, Jönsson G, Sjölander A. M2-like macrophages induce colon cancer cell invasion via matrix metalloproteinases. *Journal of Cellular Physiology* 2017; 232(12):3468–80.
 96. Ishida H, Murata N, Tada M, Okada N, Hashimoto D, Kubota S, Shirakawa K, Wakasugi H. Determining the levels of matrix metalloproteinase-9 in portal and peripheral blood is useful for predicting liver metastasis of colorectal cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2003; 33(4):186–91.
 97. Galeazzi F, Haapala EM, van Rooijen N, Vallance BA, Collins SM. Inflammation-induced impairment of enteric nerve function in nematode-infected mice is macrophage dependent. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2000; 278(2):G259-265.
 98. Khatib AM, Fallavollita L, Wancewicz EV, Monia BP, Brodt P. Inhibition of hepatic endothelial E-selectin expression by C-raf antisense oligonucleotides blocks colorectal carcinoma liver metastasis. *Cancer Research* 2002; 62(19):5393–8.
 99. Mannori G, Santoro D, Carter L, Corless C, Nelson RM, Bevilacqua MP. Inhibition of colon carcinoma cell lung colony formation by a soluble form of E-selectin. *The American Journal of Pathology* 1997; 151(1):233–43.
 100. Kan Z, Ivancev K, Lunderquist A, McCuskey PA, Wright KC, Wallace S, McCuskey RS. In vivo microscopy of hepatic tumors in animal models: a dynamic investigation of blood supply to hepatic metastases. *Radiology* 1993; 187(3):621–6.
 101. Griffini P, Smorenburg SM, Verbeek FJ, van Noorden CJ. Three-dimensional reconstruction of colon carcinoma metastases in liver. *Journal of Microscopy* 1997; 187(Pt 1):12–21.
 102. Ding L, Sunamura M, Kodama T, Yamauchi J, Duda DG, Shimamura H, Shibuya K, Takeda K, Matsuno S. In vivo evaluation of the early events associated with liver metastasis of circulating cancer cells. *British Journal of Cancer* 2001; 85(3):431–8.
 103. Taketo MM, Edelmann W. Mouse Models of Colon Cancer. *Gastroenterology* 2009; 136(3):780–98.
 104. Partecke IL, Käding A, Sendler M, Alber S, Kühn JP, Speerforck S, Röse S, Seubert S, Diedrich S, Kühn S, Weiss UF, Mayerle J, Lerch MM, Hadlich S, Hosten N, Heidecke CD, Puls R, von Bernstorff W. In vivo imaging of pancreatic tumours and liver metastases using 7 Tesla MRI in a murine orthotopic pancreatic cancer model and a liver metastases model. *BMC Cancer* 2011; 11(1):40.
 105. Brückner M, Lenz P, Nowacki TM, Pott F, Foell D, Bettenworth D. Murine endoscopy for in vivo multimodal imaging of carcinogenesis and assessment of intestinal wound healing and inflammation. *Journal of Visualized Experiments* 2014; (90).
 106. Brückner M, Lenz P, Mücke MM, Gohar F, Willeke P, Domagk D, Bettenworth D.

- Diagnostic imaging advances in murine models of colitis. *World Journal of Gastroenterology* 2016; 22(3):996–1007.
107. Seguin J, Doan BT, Latorre Ossa H, Jugé L, Gennisson JL, Tanter M, Scherman D, Chabot GG, Mignet N. Evaluation of nonradiative clinical imaging techniques for the longitudinal assessment of tumour growth in murine CT26 colon carcinoma. *International Journal of Molecular Imaging* 2013; 2013:983534.
 108. Durkee BY, Weichert JP, Halberg RB. Small animal micro-CT colonography. *Methods* 2010; 50(1):36–41.
 109. Pickhardt PJ, Halberg RB, Taylor AJ, Durkee BY, Fine J, Lee FT, Weichert JP. Microcomputed tomography colonography for polyp detection in an in vivo mouse tumor model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102(9):3419–22.
 110. Boone JM, Velazquez O, Cherry SR. Small-animal X-ray dose from micro-CT. *Molecular Imaging* 2004; 3(3):149–58.
 111. Larsson AE, Melgar S, Rehnström E, Michaelsson E, Svensson L, Hockings P, Olsson LE. Magnetic resonance imaging of experimental mouse colitis and association with inflammatory activity. *Inflammatory Bowel Disease* 2006; 12(6):478–85.
 112. Young MR, Ileva LV, Bernardo M, Riffle LA, Jones YL, Kim YS, Colburn NH, Choyke PL. Monitoring of tumor promotion and progression in a mouse model of inflammation-induced colon cancer with magnetic resonance colonography. *Neoplasia* 2009; 11(3):237–246.
 113. Mustafi D, Fan X, Dougherty U, Bissonnette M, Karczmar GS, Oto A, Hart J, Markiewicz E, Zamora M. High-resolution magnetic resonance colonography and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in a murine model of colitis. *Magnetic Resonance in Medicine* 2010; 63(4):922–9.
 114. Wong TY, Lam WW, So NM, Lee JF, Leung KL. Air-inflated magnetic resonance colonography in patients with incomplete conventional colonoscopy: Comparison with intraoperative findings, pathology specimens, and follow-up conventional colonoscopy. *The American Journal of Gastroenterology* 2007; 102(1):56–63.
 115. Lam WW, Leung WK, Wu JK, So NM, Sung JJ. Screening of colonic tumors by air-inflated magnetic resonance (MR) colonography. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2004; 19(4):447–52.
 116. Saar B, Meining A, Beer A, Settles M, Helmberger H, Frimberger E, Rummeny EJ, Rösch T. Prospective study on bright lumen magnetic resonance colonography in comparison with conventional colonoscopy. *The British Journal of Radiology* 2007; 80(952):235–41.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät und keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Berlin, den 04.03.2018

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Claus-Dieter Heidecke bedanken, der die Rahmenbedingungen für das Entstehen dieser Arbeit geschaffen und mir den Einstieg in das Berufsleben ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfram von Bernstorff danke ich für die Überlassung des Themas, die sehr gute Betreuung während der Arbeit, sowie die Unterstützung und mutmachenden Worte während der letzten Jahre.

Mein ganz besonderer Dank gilt darüber hinaus Herrn PD Dr. med. Lars Ivo Partecke für die sehr gute und intensive Betreuung, seine ständige Erreichbarkeit bei Fragen oder Problemen und seine Begeisterungsfähigkeit, ohne die ich sicher nicht so viel Freude am wissenschaftlichen Arbeiten entwickelt hätte.

Stefan Hadlich danke ich für sein großes Engagement und seine Hilfe bei den Untersuchungen im Kleintier-MRT. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Nele Albers und Swantje Hagemann für die geduldige Einarbeitung und die vielen netten, gemeinsamen Stunden im Labor.

Zuletzt möchte ich meiner Familie ganz besonders danken für ihre bedingungslose Unterstützung und ihr Verständnis während der letzten Jahre. Danke, dass ihr immer für mich da wart, mich umsort und an mich geglaubt habt.