

Andreas Termer

Dr. med.

Experimentelle Etablierung und Evaluation lokoregionaler Chemotherapie des hepatozellulären Karzinoms mittels neutrophiler Granulozyten als Trojanisches Pferd

Fach/ Einrichtung: Chirurgie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Eduard Ryschich

Zielsetzung

Da das hepatozelluläre Karzinom im fortgeschrittenen Stadium überwiegend arteriell mit Blut versorgt wird, gehört die transarterielle Chemoembolisation zu den etablierten Therapieoptionen. Aufgrund inhomogener Verteilung der Beads, einer unzuverlässigen Penetration tiefer Tumoranteile sowie einer inadäquaten Ansprechrate kann mittels des aktuellen Therapieansatzes keine kurative Behandlung durchgeführt werden.

Das Prinzip des Trojanischen Pferds beruht auf einem zellvermittelten Substanztransport zu einem gewünschten Wirkort und der anschließenden Freisetzung des Therapeutikums innerhalb eines adäquaten Zeitraums.

In der vorgelegten Studie soll die Effektivität der Kombination aus zellvermitteltem Substanztransport – mit DOX beladene neutrophile Granulozyten - und der intraarteriellen Zellapplikation zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms auf ihre Wirksamkeit untersucht werden.

Ergebnisse

Der Resazurin-Viabilitätsassay zeigte eine adäquate Dosis-Wirkungs-Relation vom Wirkstoff DOX auf humane Tumorzellen. *In vitro* konnte eine ausreichend hohe Beladung und Freisetzung des DOX/ Caelyx durch neutrophile Granulozyten gezeigt werden, wobei das intrazelluläre Chemotherapeutikum eine Tendenz zur intra-nukleären Verlagerung aufwies. Mit Ketoprofen und photolysiertem Calcein konnten zwei Substanzen zur Immobilisierung der Neutrophilen validiert werden. Mit Hilfe der Flusskammerexperimente konnte eine stärkere Adhäsion humaner Neutrophiler an murines ICAM-1 als an humanes ICAM-1 gezeigt werden. Im isolierten Leberperusionsmodell konnte *ex vivo* eine >90%ige Sequestrierungseffizienz der Immunzellen in murinen Lebersinusoiden detektiert werden. Ein embolisierender Effekt der Sequestrierung konnte sowohl bei der isolierten Leberperfusion *ex vivo* als auch durch die intraarterielle Substanzapplikation *in vivo*

fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde *in vivo* eine ausgeprägte Sequestrierung neutrophiler Granulozyten im peritumoralen Lebergewebe, jedoch nicht in tumoralen Gefäßen nachgewiesen. Die zeitraffertechnische Darstellung der intravasalen Migration zeigte eine ausgeprägte, aber ungerichtete Bewegung der Neutrophilen in den Lebersinusoiden, jedoch nahezu keine in den Tumorgefäßen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der intratumoralen Gefäßstruktur zeigten einen größeren Gefäßdurchmesser dieser im Vergleich zu Lebersinusoiden, wobei Hep55.1C zusätzlich eine höhere Gefäßdichte aufwies als Panc02. Die Analyse unterschiedlicher Organsysteme konnte eine ausgeprägte Neutrophilensequestrierung in peritumoralen Lebersinusoiden und der Lunge, jedoch deutlich weniger in der Milz und den Tumorentitäten nachweisen. Als *proof-of-principle*-Ansatz konnte eine Sequestrierung aktivierter Makrophagen sowohl mit Hilfe der isolierten Leberperfusion *ex vivo* als auch mit Hilfe der intraarteriellen Substanzapplikation *in vivo* in den Lebersinusoiden sowie zusätzlich den Tumorgefäßen detektiert werden.

Diskussion und Schlussfolgerung

Im Allgemeinen gilt, dass trotz solitär embolisierter Gefäße *in vivo* nahezu keine neutrophilen Granulozyten in den Tumorgefäßen beobachtet werden konnten, was zum einen durch vergrößerten Durchmesser von Tumorblutgefäßen und zum anderen durch verändertes Tumorgefäßendothel, bei verminderter Expression der Adhäsionsproteine zu erklären ist. Ferner gilt, dass die hohe Sequestrierungseffizienz neutrophiler Granulozyten in Lebersinusoiden und Lungenkapillaren *ex vivo* und *in vivo* vermutlich auf deren Aktivitätszustand zurückzuführen ist. Zusätzlich könnte in den Lungenkapillaren das Größenverhältnis der Immunzellen zum Lumendurchmesser sowie die Änderung rheologischer Eigenschaften Neutrophiler zur Sequestrierung beigetragen haben. Neben der Sequestrierung konnte eine mehr oder minder suffiziente Embolisation der Lebersinusoiden und Tumorgefäße beobachtet werden. *Ex vivo* schien v. a. der Hämatokritwert einen wichtigen Einfluss auf die Embolisation auszuüben. Es ist nicht zu erwarten, dass diese Art der Embolisation einen Effekt auf das Tumorwachstum hätte.

Unabhängig von den *ex vivo*- und *in vivo*-Ergebnissen konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass der Resazurin-Viabilitätsversuch ein valides Verfahren zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Relation unterschiedlicher DOX-Darreichungsformen an humanen Tumorzellen ist, wobei beobachtete Effekte durch Optimierung der Methodik behoben werden können. Vorteilhaft scheint die schnelle und suffiziente Beladung und Freisetzung des DOX zu sein. Ungeklärt bleibt die Frage nach der intrazellulären Wirkstoff-verlagerung sowie der Zelltoxizität gegenüber den Substanzträgern. Um eine längere Verbleibdauer

beladener Immunzellen im Tumor zu gewährleisten, wurden Ketoprofen und photolysiertes Calcein als geeignete immobilisierende Substanzen identifiziert.

Dass die lokoregionale zelluläre Substanzapplikation einen Überlebensvorteil bieten würde, ist unwahrscheinlich. Verbesserungsvorschläge, wie das Konzept der postoperativen lokoregionalen Zellapplikation könnten zum Erfolg der Tumorthherapie und der Therapie anderer Erkrankungen beitragen.