

**Wachstumsverhalten fokaler hepatozellärer
Veränderungen in Putenembryonen und die Wirkung
von Sorafenib und Cisplatin auf normale und
präneoplastische Zellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

BETTINA KÄSTNER

aus Neundorf

Bonn 2014

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter PD Dr. Harald Enzmann

2. Gutachter Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Tag der Promotion: 13.11.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Hepatozelluläres Karzinom	1
1.2 Chemische Karzinogenese	2
1.3 Modelle zum Test potenzieller Tumorthapeutika	3
1.3.1 <i>In-vitro</i> -Modelle	3
1.3.2 <i>In-vivo</i> -Modelle	4
1.3.3 <i>In-ovo</i> -Modelle	5
1.4 Modell der embryonalen Putenleber zum Test potenzieller Tumorthapeutika	5
1.4.1 Tumorinduktion	6
1.4.2 Induzierte Veränderungen	6
1.4.3 Untersuchte Tumorthapeutika	7
2 Zielsetzung	10
3 Material und Methoden	12
3.1 Laborbedarf	12
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	12
3.1.2 Lösungen für Zellkultur	14
3.1.3 Enzyme	14
3.1.4 Spezialchemikalien für Immunhistochemie	15
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	15
3.1.6 Geräte	16
3.2 Begriffsdefinitionen	18
3.3 Umgang mit Puteneiern bzw. Putenembryonen	18
3.3.1 Brutbedingungen	19
3.3.2 Überprüfung der Embryonen auf Vitalität	19
3.3.3 Verabreichung der verwendeten Lösungen	19
3.3.4 Leberpräparation	20

3.3.5	Aufbereitung der Lebern für die Histologie und Histochemie	21
3.4	Methodenentwicklung	22
3.4.1	Allgemeiner Versuchsablauf	22
3.4.2	Induktion fokaler hepatozellulärer Veränderungen (FAH)	22
3.4.3	Dosisfindung der Tumortheraeutika	23
3.4.4	FAH-Induktion und Behandlung mit Sorafenib bzw. Cisplatin	25
3.4.5	Histologische und histochemische Methoden	26
3.5	Analyse der histologisch und histochemisch aufbereiteten Schnitte der embryonalen Putenleber	33
3.5.1	Mikroskopie und Bildaufnahme	33
3.5.2	Beurteilung des fokalen bzw. extrafokalen Lebergewebes	34
3.5.3	Morphometrische Quantifizierung der FAH	35
3.5.4	Klassifikation der FAH	36
3.5.5	Analyse von Zellproliferation und Zellverlust im extrafokalen bzw. fokalen Lebergewebe	36
3.5.6	Analyse der FAH mit stereologischen Berechnungen	41
3.6	Statistische Auswertung	44
3.7	Primärzellkultur	45
3.7.1	Verwendete Lösungen	45
3.7.2	Ablauf	45
3.7.3	Färbung der Objektträger	46
3.8	Bestimmung des Platingehalts im Gewebe	47
3.8.1	Messmethode	47
3.8.2	Ablauf	47
3.8.3	Berechnung	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Methodenentwicklung	49
4.1.1	Induktion fokaler hepatozellulärer Veränderungen	49

4.1.2	Dosisfindung Sorafenib	54
4.1.3	Dosisfindung Cisplatin	57
4.1.4	Proliferationsmessung	61
4.1.5	Zellverlustmessung	66
4.1.6	Stereologie	66
4.2	Durch DEN induzierte Veränderungen in der embryonalen Putenleber	69
4.2.1	Megalozyten	70
4.2.2	Fokale hepatozelluläre Veränderungen (FAH)	73
4.2.3	Zellproliferation und Zellverlust in fokalen hepatozellulären Veränderungen und extrafokalem Lebergewebe	76
4.3	Effekte durch Sorafenib	79
4.3.1	Einfluss von Sorafenib auf Putenembryonen	79
4.3.2	Einfluss von Sorafenib auf Zellproliferation und -verlust in extrafokalem Lebergewebe	83
4.3.3	Einfluss von Sorafenib auf FAH	84
4.3.4	Einfluss von Sorafenib auf basophile und eosinophile FAH	90
4.3.5	Einfluss von Sorafenib auf nicht komprimierende und komprimierende FAH	96
4.3.6	Nettowachstum unter Sorafenib-Einfluss	100
4.4	Effekte durch Cisplatin	102
4.4.1	Platingehalt im Lebergewebe	102
4.4.2	Einfluss von Cisplatin auf Putenembryonen	103
4.4.3	Einfluss von Cisplatin auf Zellproliferation und -verlust in extrafokalem Lebergewebe	107
4.4.4	Einfluss von Cisplatin auf FAH	108
4.4.5	Einfluss von Cisplatin auf basophile und eosinophile FAH	115
4.4.6	Einfluss von Cisplatin auf nicht komprimierende und komprimierende FAH	124

4.4.7	Nettowachstum unter Cisplatin-Einfluss	130
5	Diskussion	132
5.1	Auswahl der Methoden	132
5.1.1	Induktion fokaler hepatozellulärer Veränderungen mit Diethylnitrosamin	132
5.1.2	Induktion fokaler hepatozellulärer Veränderungen mit Diethylnitrosamin und Promotoren	133
5.1.3	Histologische Darstellung von Zellproliferation und -verlust	133
5.1.4	Berechnung von Zellproliferation und -verlust	135
5.2	Charakterisierung der durch DEN induzierten hepatozellulären Veränderungen	135
5.2.1	Behandlungsinduzierte Auffälligkeiten im extrafokalen Lebergewebe	135
5.2.2	Charakterisierung der fokalen hepatozellulären Veränderungen	136
5.3	Effekte der Tumorthapeutika	139
5.3.1	Dosisfindung Sorafenib und Cisplatin	139
5.3.2	Effekt von Sorafenib auf das embryonale Putenlebergewebe	143
5.3.3	Bedeutung unserer Ergebnisse des Sorafenib-Effektes für die Anwendung beim Menschen	147
5.3.4	Effekt von Cisplatin auf das embryonale Putenlebergewebe	148
5.4	Putenembryo als Modell zum Test potenzieller Tumorthapeutika	150
6	Zusammenfassung	154
7	Literaturverzeichnis	156
8	Anhang	168
8.1	Zusatzmaterial	168
8.2	Danksagung	178

Abkürzungsverzeichnis

3-MC	3-Methylcholanthren
Abb.	Abbildung
Wasser	Aqua ad injectabilia
BCF	(basophilic cell focus) basophiler FAH
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
CAM	Chorio-Allantois-Membran
CCF	(clear cell focus) klarzelliger FAH
CP	Cisplatin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC 1 und DC 2	erster und zweiter DEN+CP-Versuch
DEN	Diethylnitrosamin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS 1 und DS 2	erster und zweiter DEN+SF-Versuch
dx (Bsp. d0)	Versuchstag x (Bsp. Versuchstag 0)
ECF	(eosinophilic cell focus) eosinophiler FAH
EF	extrafokales Lebergewebe
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FAH	(foci of altered hepatocytes) fokale hepatozelluläre Veränderungen
FAH(k)	fokale hepatozelluläre Veränderungen mit Kompression des umliegenden Gewebes
FAH(nk)	fokale hepatozelluläre Veränderungen ohne Kompression des umliegenden Gewebes
FKS	fetales Kälberserum
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
k. Z.	kein Zusammenhang
Kla	Klasse
KI	(95%-) Konfidenzintervall
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade
MeOH	Methanol

min	Minute
MW	Mittelwert
n	Anzahl
PB	Phenobarbital
PBS	(phosphate buffered saline) Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
rcf	(relative centrifugal force) relativen Zentrifugalbeschleunigung
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
SF	Sorafenib
Tab.	Tabelle
TUNEL-Assay	Terminal-deoxy-nucleotidyl-transferase mediated d-UTP nick-end-labeling

1 Einleitung

In der Forschung umfasst die Thematik „Krebserkrankungen“ zum einen die Frage der Entstehung und zum anderen die Möglichkeiten der Therapie. Je detaillierter entschlüsselt wird, wie sich Zellen während der Krebsentstehung verändern, desto mehr Möglichkeiten eröffnen sich, diese veränderten Zellen gezielt zu beeinflussen. Diese „zielgerichtete“ Therapie unterscheidet sich dabei von der Therapie mit zytotoxischen Tumortherapeutika, die nicht auf die Ursache der Zellveränderung zielen, sondern an den späteren Folgeveränderungen, beispielsweise einer erhöhten Zellproliferation, ansetzt. Zur Entwicklung möglicher Therapien ist der Einsatz geeigneter Modelle wichtig, die möglichst viele Charakteristika der komplexen *In-vivo*-Situation abbilden, d. h. der Situation im Patienten vergleichbar sind.

Die vorliegende Arbeit stellt eine bisher nicht beschriebene Möglichkeit vor, Putenembryonen als Modell zum Test potenzieller Tumortherapeutika einzusetzen. Es wurde der Effekt verschiedener Tumortherapeutika auf chemisch induzierte präneoplastische und neoplastische Läsionen und auf das Wirtsgewebe (embryonale Putenleber) untersucht.

1.1 Hepatozelluläres Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eine der häufigsten Krebsarten weltweit. Es ist eine der Krebsarten, die zu den meisten durch Krebs verursachten Todesfällen führt [1, 2]. Die Krankheit verläuft meist symptomlos und wird größtenteils erst in einem späten Stadium entdeckt [2]. Wichtige Risikofaktoren der Entstehung von Leberzellkrebs sind die Leberzirrhose, die Infektion mit dem Hepatitis B- bzw. Hepatitis C-Virus und Alkoholmissbrauch. Darüber hinaus können auch Stoffwechselkrankheiten und Umweltgifte Leberzellkrebs auslösen [2, 3].

Das Krankheitsstadium bestimmt die Wahl der Behandlung. In frühen Stadien des HCC finden vorwiegend die chirurgische Entfernung von Leberbereichen und die Lebertransplantation Anwendung. Bei fortgeschrittenem HCC wird die systemische Therapie eingesetzt [2, 4]. Während für die z. T. seit Jahrzehnten verfügbaren zytotoxischen Tumortherapeutika keine Wirkung auf das HCC nachgewiesen werden konnte, steht seit der Entwicklung der „zielgerichteten Therapien“ mit dem

Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib erstmals eine wirksame pharmakologische Therapieoption zur Verfügung [5], deren Nutzen jedoch ebenfalls beschränkt ist.

1.2 Chemische Karzinogenese

Gemäß dem allgemein angenommenen Modell umfasst Karzinogenese drei Schritte: Initiation, Promotion und Progression. Krebs kann durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst werden. Im Nachfolgenden liegt der Fokus auf der in dieser Arbeit angewandten chemischen Induktion.

Die in unserer Arbeit verwendeten chemischen Stoffe interagieren direkt mit der DNA und verändern diese. Werden DNA-Schäden an kritischer Stelle nicht durch einen der vielen vorhandenen Reparaturmechanismus beseitigt, entsteht eine sogenannte initiierte Zelle. Für die Krebsentstehung sind Mutationen in Wachstumskontrollgenen, Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen bedeutend, denn sie beeinflussen die Teilungsfähigkeit oder Apoptose der Zelle [6]. Während der Phase der sogenannten Promotion teilt sich die initiierte Zelle im Vergleich zur Umgebung vermehrt. Es kommt zur klonalen Expansion [6] und zur Bildung fokaler Läsionen [7]. Der Vorgang der Promotion kann durch bestimmte Stoffe gefördert werden. Diese Promotoren interagieren dabei nicht direkt mit der DNA, sondern beeinflussen die Zellproliferation oder Apoptose. Dieser Schritt ist zumindest teilweise reversibel – ohne fortgesetzte Einwirkung des Promotors können fokale Läsionen z. B. durch Apoptose zurückgebildet werden [8]. Erst durch Mutationen, die eine autonome Zellteilung der veränderten Zelle ermöglichen und so zu Neoplasien führen, wird der Prozess irreversibel, d. h. wird Krebs im Gewebe etabliert. Der Schritt der Progression zeichnet sich unter anderem aus durch weiteres Wachstum des Tumors, Metastasierung und genetische Instabilität [7, 8].

1.3 Modelle zum Test potenzieller Tumorthapeutika

Die Suche nach dem passenden Arzneimittel zur Behandlung einer bestimmten Art von Krebs ist langwierig. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden dafür viele Versuchsanordnungen entwickelt. Im Folgenden werden kurz einige *In-vitro*- und *In-vivo*-Modelle beschrieben.

1.3.1 *In-vitro*-Modelle

Tumorthapeutika wirken direkt zytotoxisch auf die Tumorzelle oder richten sich gegen die Blutversorgung des Tumors, um das Tumorstadium zu unterbinden. Mit dem vom US-amerikanischen Nationalen Krebsinstitut (National Cancer Institute) entwickelten Zelltest ist es möglich, Substanzen auf ihre zytotoxische Fähigkeit hin zu untersuchen. Im Rahmen dieses Testes werden 60 humane Krebszelllinien, die sieben verschiedenen Krebsarten entstammen, analysiert [9]. Substanzen, die in etwa bei denselben Zelllinien einen Effekt zeigen, scheinen einen gleichen Wirkmechanismus zu haben und sind für weitere Untersuchungen interessant [10]. Dieser Test umfasst allerdings nicht das Verhältnis sich weiter teilender Zellen und abgestorbener Zellen. Dies wird bei der Untersuchung mit dem klonogenen Assay beachtet [11]. Dabei wird der Effekt von Substanzen auf das Wachstum der Kolonien frisch gewonnener Krebszellen von Patienten untersucht. Limitierend dabei ist die Tatsache, dass nicht alle gewonnenen Proben in Zellkulturen wachsen und die Koloniegröße ein kritischer Faktor ist [9]. Unter Verwendung der 60 Krebszelllinien potenziell wirksame Stoffe herauszufiltern ist auf Grund etablierter Zelllinien standardisierbar und automatisierbar und zudem in kurzer Zeit durchführbar. Nachteilig ist das einschichtige Wachstum der Zellen, was sich deutlich von den tatsächlichen Bedingungen in einem dreidimensionalen Tumor unterscheidet. Dieser weist z. B. durch die geringe Anzahl an Blutgefäßen Gradienten bei der Nährstoffversorgung auf. In Zellkulturen ist eine gleichmäßige Verteilung zugesetzter Stoffe gegeben. Gerade in größeren Tumoren ist dagegen nicht bekannt, wie schnell und in welcher Konzentration sich Tumorthapeutika im Tumor ausbreiten. Hierfür können Sphäroid-Modelle einen Ansatz bieten. Tumorzellen wachsen dabei als Aggregate in Flüssigkultur und bieten einen dreidimensionalen Ansatz [11].

Die Suche nach Kandidaten für die weitere Entwicklung neuer Tumorthapeutika unter Verwendung von Zellkulturen aus Krebszelllinien ist eine schnelle und kostengünstige

Methode [9]. Jedoch werden dabei auch falsche Ergebnisse erhalten, da das Zusammenspiel von Tumor und Umgebung fehlt. Deshalb werden interessante Kandidaten der *In-vitro*-Tests in anknüpfenden *In-vivo*-Tests weiter auf eine anti-tumorale Eigenschaft untersucht.

1.3.2 *In-vivo*-Modelle

Der „Hollow-Fiber-Assay“ ist ein verhältnismäßig schnell durchführbarer Test potenzieller Tumorthapeutika unter Verwendung eines Mausmodells. Dabei wachsen Zelllinien in biokompatiblen Hohlfasern (hollow fiber) aus, die anschließend in Mäuse implantiert werden. Nach wenigen Tagen Behandlung mit der zu testenden Substanz wird das Zellsterben ermittelt [9, 10, 12].

In immungeschwächten Mäusen ist es möglich, Zellen aus humanen Tumorzelllinien subkutan in Mäuse zu injizieren, die zu einem Tumor auswachsen können. Unter Verwendung dieses Xenograft-Modells konnte der Effekt von Substanzen auf Tumorwachstum in einer natürlichen Umgebung untersucht werden. Das orthotope Xenograft-Modell ist eine Weiterentwicklung dieses Modells. Zellen humaner Krebszelllinien oder Anteile des Tumors einer Patientenprobe werden in das entsprechende Gewebe der Maus verpflanzt, dem sie entstammen [13]. Mit beiden Methoden ist es möglich, im selben Experiment den Einfluss einer Substanz auf humane Tumorzellen und einen Organismus zu untersuchen. Allerdings bildet dieses Modell nicht genau die Situation eines Organismus ab, in dem sich der Tumor gebildet hat [11]. Auch kann die im Xenograft-Modell ermittelte Wirksamkeit eines Stoffes von der Wirksamkeit im Menschen variieren [14] oder sich nicht bestätigen [9]. Besonders orthotope Xenograft-Modelle sind kostspielig und nehmen viel Zeit in Anspruch [15].

Einen weiteren Ansatz für den Test potenzieller Tumorthapeutika an Tumoren in einer natürlichen Umgebung stellen Modelle dar, in denen Tumoren in einem lebenden Organismus induziert werden. So zum Beispiel in genetisch veränderten Mausmodellen. Nachteile dieses Modells sind jedoch, dass sich nicht in allen Tieren Tumore entwickeln, dass sich deren Entwicklungszeit auf mehrere Monate beläuft und weiterhin dass die Tumorentifikation je nach Krebsart schwierig ist [16]. Daneben können Tumore auch chemisch induziert werden. Derartige Versuche werden vorrangig an Nagern durchgeführt. Allerdings findet dieses Modell zum Test potenzieller

Tumorthapeutika keine breite Verwendung. Im Vergleich zu Xenograft-Modellen dauern die Versuche länger und ist insgesamt sehr kostenintensiv [15].

1.3.3 *In-ovo*-Modelle

Neben Nagermodellen zeigen auch *In-ovo*-Modelle Potenzial zum Test von Tumorthapeutika. So ist es möglich, humane Tumorzellen auf der Chorio-Allantois-Membran (CAM) von Hühnern wachsen zu lassen. Dieser Assay wurde hauptsächlich für Untersuchungen der Angiogenese durchgeführt [17]. Die CAM zeichnet sich durch viele Blutgefäße aus und dient unter anderem dem Gasaustausch zwischen Embryo und Luftblase des Eies [18]. An den auf der CAM gewachsenen Tumorzellen lässt sich überdies auch die Zytotoxizität von Substanzen testen [17].

Unter Verwendung karzinogener Stoffe lassen sich auch Tumoren *in ovo* induzieren. Dies konnte am Beispiel von Putenembryonen gezeigt werden [19, 20]. Das Prinzip geht auf den von Enzmann et al. [21] entwickelten „*In-ovo*-Carcinogenicity-Assay“ zurück, mit dem diverse Substanzen auf ihre karzinogene Eigenschaft getestet wurden. Auf diesem Assay aufbauend wurde in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit untersucht, den Putenembryo zum Test potenzieller Tumorthapeutika einzusetzen.

1.4 Modell der embryonalen Putenleber zum Test potenzieller Tumorthapeutika

Durch verschiedene Karzinogene lassen sich präneoplastische und neoplastische Läsionen in der embryonalen Putenleber hervorrufen [19, 20]. Diese Läsionen sind von normalem Ursprungsgewebe umgeben. Dies entspricht der Situation eines Primärtumors beim Menschen. Aufbauend auf die chemische Induktion der Leberläsionen erschließt sich die Möglichkeit Substanzen auf ihre anti-tumorale Wirkung zu testen. Ein großer Vorteil des Modells ist, dass es sich im Vergleich zur Großzahl der *In-vivo*-Modelle rechtlich nicht um einen Tierversuch handelt und somit keine aufwendigen Genehmigungsverfahren durchzuführen sind. Laut dem gültigen „Europäisches Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere“ vom 18. März 1986 ist ein embryonaler Organismus kein Tier. Zudem sind die jeweiligen Versuchsschritte schnell durchführbar und auch die „Pflege“ der Eier im Brutschrank nimmt im Vergleich zur Versorgung von Nagern

wenig Zeit in Anspruch, so dass in einem Experiment große Gruppen untersucht werden können.

1.4.1 Tumorinduktion

In unserem Modell wurde Diethylnitrosamin (DEN) für die chemische Karzinogenese verwendet. Zahlreichen Studien an Tieren haben eine Kanzerogenität in unterschiedlichen Körperregionen verschiedener Spezies nachgewiesen. So induziert DEN beispielsweise Lebertumoren in Ratten, Hunden, Goldhamstern, Kaninchen und Meerschweinchen, Nierentumoren in Ratten und Lungentumoren in Mäusen und Hamstern [22, 23]. Auf Grund dieser Befunde wird auch für den Menschen eine krebserregende Wirkung von DEN angenommen [24].

DEN zählt als Vertreter von Nitrosaminen zu alkylierenden Stoffen. Die karzinogene Eigenschaft ergibt sich aus der möglichen Interaktion mit der DNA. Hierfür ist eine metabolische Aktivierung nötig, die durch Cytochrom P450-Isoenzyme vermittelt wird [23]. Alkylierende Stoffe interagieren auf verschiedene Weise mit der DNA, häufig mit Verbindungen über den Stickstoffring von DNA-Basen oder den Sauerstoffatome außerhalb dieses Ringes und mit Sauerstoffverbindungen innerhalb den Nukleotidverbindungen [23, 25, 26]. Die Adduktbildung kann zu Fehlern in der Basenpaarung oder zu Strangbrüchen führen [23, 25].

Die Tumorinduktion in der embryonalen Putenleber ist zuverlässig und robust. In drei unabhängigen Laboren konnten vergleichbare Leberläsionen in Putenembryonen nach dem hier angewendeten Modell induziert werden [27]. Gegenüber der vergleichbaren chemischen Tumorinduktion durch DEN in Maus oder Ratte beansprucht der Assay mit Putenembryonen weniger Zeit. Innerhalb von 24 Tagen entwickeln sich in der embryonalen Putenleber Läsionen. In Nagerlebern werden Läsionen nach mehreren Wochen sichtbar [23, 28]. Nach der Initiation der chemischen Karzinogenese mit DEN kann die Bildung hepatozellulärer Läsionen in Nagern durch Promotoren um ein Vielfaches gesteigert werden. Häufig findet Phenobarbital dabei Anwendung [23].

1.4.2 Induzierte Veränderungen

Die durch DEN induzierten Veränderungen des Lebergewebes der Putenembryonen sind klar dosisabhängig. Bei Einwirkung niedriger Dosen DEN finden sich ungewöhnlich große Hepatozyten mit vergrößertem Zellkern. Sie werden als

Megalozyten [29, 30] oder Hepatozyten mit Karyomegalie [31, 32] bezeichnet. Mit steigender Dosis steigt die Zahl der Megalozyten [33] und es treten fokale Änderungen des Lebergewebes auf [20]. Diese „foci of altered hepatocytes“ (FAH) sind vergleichbar mit den Läsionen, die in Rattenlebern induziert werden können. FAH sind Vorstufen des hepatozellulären Karzinoms [34] und werden auch als solche in Lebern von Putenembryonen definiert [19]. Mit Hilfe der als Standard der Histopathologie bekannten Hämatoxylin-Eosin-Färbung lassen sich die FAH in Gruppen einteilen. Angelehnt an die Definition bei Ratten [35] lassen sich in der embryonalen Putenleber verschiedene FAH-Typen unterscheiden: klarzellige, eosinophile und basophile FAH [20].

1.4.3 Untersuchte Tumortherapeutika

Für die Krebstherapie stehen Therapeutika mit unterschiedlichen Wirkweisen zur Verfügung. Um die therapeutische Wirkung eines potenziellen anti-tumoralen Wirkstoffes zu finden, spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Darunter zählen u. a. die Dosis und die Dauer der Anwendung. Abhängig von der Verträglichkeit in präklinischen Studien wird die Dosis für die ersten Studien im Menschen ermittelt [36]. Ausgehend von dieser werden Dosis-Eskalationsstudien durchgeführt [37].

Für Substanzen, die zielgerichtet wirken (sogenannte „targeted therapy“), wird eine hohe Effektivität ohne signifikante Toxizität erwartet. Deshalb werden neben der Toxizität andere Faktoren, wie beispielsweise die Plasmakonzentration der Substanz zur Bestimmung der therapeutischen Dosis im Menschen benutzt. Allerdings hat sich beispielsweise für Sorafenib gezeigt, dass auch für diese „zielgerichteten Therapien“ ausgeprägte Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen, die zudem häufig dosislimitierend sind [37]. Daneben finden zytotoxische Substanzen in der Krebstherapie Anwendung. Diese können auf sich teilende Zellen einwirken. Mit steigender Dosis erhöht sich ihre Effektivität, gleichzeitig aber auch ihre Toxizität. Sie haben in der Regel ein sehr geringes therapeutisches Fenster und die anti-tumorale Wirkung wird nur bei Dosierungen erzielt, die bereits zu ausgeprägten Nebenwirkungen führen [36].

In der vorliegenden Arbeit wurde Sorafenib als Vertreter der „zielgerichteten Therapien“ und Cisplatin als Vertreter zytotoxischer Substanzen untersucht. Abhängig von der Applikationsform beim Menschen wurde für unser Modell die

Applikationsroute für den Putenembryo gewählt. Beim Menschen oral applizierte Arzneimittel (Sorafenib) wurden deshalb in Analogie in das Eiklar injiziert um über dieses vom Putenembryo aufgenommen zu werden. Es konnte an Hühnereiern bestätigt werden, dass eine ins Eiklar injizierte Substanz in den Blutkreislauf des Hühnerembryos gelangt [38]. Daneben kann auch die stark vaskularisierte Chorio-Allantois-Membran (CAM) als Resorptionsort von Substanzen in den Putenembryo dienen. So wurden selbst auf die CAM von Hühnereiern aufgetragene Tumorzellen wurden im Hühnerembryo wiedergefunden [39]. Demzufolge können in der Anwendung beim Menschen intravenös verabreichte Arzneimittel (Platinkomplexe) über die CAM auf den Putenembryo einwirken.

1.4.3.1 Sorafenib

Momentan ist Sorafenib (Nexavar[®]) der einzig zugelassene Arzneistoff zur Therapie des HCC, speziell im fortgeschrittenen Stadium. Es wird eingesetzt, wenn das chirurgische Entfernen des Tumors oder eine Lebertransplantation nicht möglich sind und andere Therapien, wie z. B. mechanische oder chemische Blockade der Blutzufuhr des Tumors nicht zum gewünschten Erfolg führen. [40, 41] Durchschnittlich wird das Überleben der Patienten von 7,9 Monaten in der Kontrollgruppe auf 10,7 Monate in der Sorafenib-Gruppe verlängert [42].

Leberkrebszellen zeigen bestimmte genetische Veränderungen gegenüber normalen Leberzellen. Beispielsweise zeigen sich Unterschiede in den Signalwegen, die die Angiogenese und das Zellwachstum beeinflussen. Dieses wird zur Entwicklung zielgerichteter Therapeutika genutzt [43, 44]. Der Multikinaseinhibitor Sorafenib (Abb. 1) inhibiert verschiedene Formen der Raf Serin/Threonin-Kinasen, die Bestandteil des MAPK-Signalweges sind. Dies kann zur Apoptose der Tumorzellen führen. Zudem kann Sorafenib auch einige Rezeptortyrosinkinasen, die die Angiogenese fördern, blockieren [41, 45].

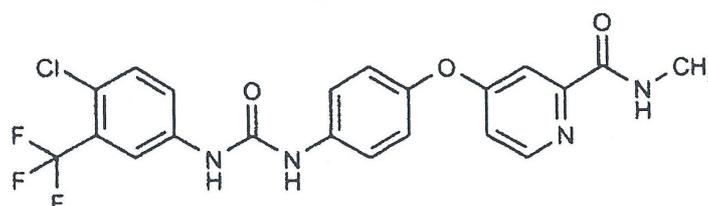


Abb. 1: Strukturformel von Sorafenib

Neben Sorafenib werden aktuell auch andere zielgerichtete Moleküle untersucht [44, 46, 47]. Diese sind entweder gegen die gleichen Signalwege wie Sorafenib gerichtet oder gegen andere Signalwege, die auch Zellwachstum, Apoptose oder Angiogenese steuern [43]. Derzeit werden klinische Studien durchgeführt, die den Einsatz von Sorafenib bei frühem und mittlerem Stadium von HCC prüfen [48].

1.4.3.2 Cisplatin

Cisplatin gehört zur Gruppe der Zytostatika, d.h. zu Stoffen, die Zellwachstum bzw. Zellteilung verhindern können. Auch heute noch finden Zytostatika Anwendung in der Therapie verschiedener Tumorerkrankungen [49]. Im Gegensatz zu den zielgerichteten Therapeutika wirken sie nicht speziell auf Tumorzellen, sondern auch auf gesunde, sich teilende Zellen.

Cisplatin ist der bekannteste und am längsten eingesetzte Vertreter der Platinkomplexe. Es handelt sich um einen planaren Komplex mit zentralem Platinatom und vier Liganden (Abb. 2). Als Monotherapie und in Kombination mit anderen Tumortheraeutika findet Cisplatin z. B. bei Hodentumoren, kleinzelligen Bronchialkarzinomen und fortgeschrittenem Ovarialkarzinomen Anwendung [50–52]. Unerwünschte Nebenwirkungen, wie beispielsweise Nephro- und Neurotoxizität, haben eine dosislimitierte Anwendung zur Folge [51, 52]. Des Weiteren begrenzen vermehrt auftretende Resistenzen den klinischen Einsatz [53, 54].

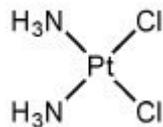


Abb. 2: Strukturformel von Cisplatin

In der klinischen Anwendung werden Platinkomplexe in Lösung intravenös verabreicht. Nach Aufnahme in die Zelle müssen sie aktiviert werden. Dies geschieht durch den Austausch von Liganden und die Bildung von Aquakomplexen. Diese können mit verschiedenen zellulären Komponenten interagieren – hauptsächlich mit der DNA. Dabei kommt es häufig zu Quervernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges, weniger zu Vernetzungen zwischen beiden DNA-Strängen. Die Bildung von Platin-DNA-Addukten kann verschiedene Zellreaktionen nach sich ziehen. Es besteht die Möglichkeit der DNA-Reparatur und des Überlebens der Zelle. Zudem kann die Apoptose oder Nekrose zum Zelltod führen [55].

2 Zielsetzung

Für die Testung potenzieller Arzneimittel in der Krebsforschung gibt es mehrere Modelle. *In-vitro*-Modelle mit einer Vielzahl verschiedener etablierter Tumorzelllinien sind schnell, einfach und gut standardisierbar. Sie werden daher häufiger verwendet als Primärzellkulturen, die eher interindividuelle Unterschiede reflektieren. Tierversuche, in denen humane Krebszellen als Tumoren in geeigneten Nagetiermodellen wachsen, stellen die klinische Situation besser nach. Allerdings bestehen auch hier Unterschiede zur klinischen Situation des Krebses beim Menschen. Der Tumor ist nicht in der „natürlichen“ Umgebung des Wirtsorganismus – humane Krebszellen sind in Nagern. Dabei sind Tests an Tieren zeit- und kostenaufwendig und bedürfen einer angemessenen ethischen Rechtfertigung. Es ist von großem Vorteil ein Modell zu finden, das zum einen eine schnelle Überprüfung anti-tumoraler Eigenschaften eines Stoffes erlaubt und zum anderen die komplexe *In-vivo*-Situation abbildet.

In Studien konnte gezeigt werden, dass sich in der embryonalen Putenleber Tumorstufen und Tumore erzeugen lassen. Dies war beispielsweise mit Diethylnitrosamin möglich. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Tumorthapeutika unter Verwendung dieses Modells. In der *In-ovo*-Situation ist der Tumor von normalem Ursprungsgewebe umgeben und Krebszellen und Wirtszellen entstammen der gleichen Spezies, sogar dem gleichen Individuum. Dies ist der Situation im Menschen vergleichbar. Im Vergleich zu den vorher genannten Modellen, ist das Modell der embryonalen Putenleber kostengünstiger und weniger zeitintensiv.

Für die Untersuchung der Tumorthapeutika im Modell der embryonalen Putenleber wurden folgende Teilziele bearbeitet:

- Auswahl des geeignetsten Induktionsmodells abhängig von Zeitpunkt und Dosis der DEN-Injektion. Dabei sollten Tumorstufen und Tumore erzeugt werden und das umgebende Lebergewebe nicht zu sehr geschädigt werden.
- Standardisierung der Messung des Zellwachstums und Zellverlustes in Tumorstufen, Tumoren und extrafokalem Lebergewebe. Auswahl einer geeigneten Methodik zur Bestimmung des Zellwachstums und Optimierung des TUNEL-Assays für die Messung des Zellverlustes.

-
- Festlegung der Dosis, der Applikationsroute und des Zeitpunktes der Applikation der Tumorthapeutika.
 - Untersuchung des Einflusses verschiedener Tumorthapeutika auf Tumorstufen, Tumoren und extrafokalem Lebergewebe. Sorafenib sollte als zielgerichtetes Therapeutikum und Cisplatin als Vertreter der Zytostatika untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Laborbedarf

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Feststoffe	Hersteller
3-Methylcholanthren (3-MC)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
D-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Tabletten	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dinatriumphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck KGaA, Darmstadt
Phenobarbital, Natriumsalz (PB)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Sorafenib (p-Toluensulfonat)	LC Laboratories, Woburn, MA, USA
Tris-Base	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Tris-Hydrochlorid ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Flüssigkeiten	Hersteller
10%ige neutral gepufferte Formalinlösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Cisplatin „Cis-GRY [®] “ (1 mg/mL)	TEVA GmbH, Ulm
Clear Rite [®] 3 (Xylolersatz)	Microm International GmbH, Walldorf
Diethylnitrosamin (1 g, flüssig)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (C ₂ H ₆ OS; DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dulbecco's PBS (ohne Calcium und Magnesium)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
EosinG	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99 % (EtOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eukitt [®]	O. Kindler GmbH, Freiburg
Glycerin EMSURE [®] ACS	Merck KGaA, Darmstadt
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol 100 % (MeOH)	Merck KGaA, Darmstadt
PURELAB [®] Plus-Wasser	ELGA Berkefeld GmbH, Celle
Salpetersäure 65 %, Suprapur [®]	Merck KGaA, Darmstadt
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe

3.1.2 Lösungen für Zellkultur

Lösung	Hersteller
Dexamethason (1,97 mg Dexamethason in 94 µL DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (ohne Calcium und Magnesium)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Gentamicin (10 mg/mL)	Gibco [®] , Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure) (HEPES; 1 M)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Insulin, Human Recombinant, Zinc Solution (4 mg/mL)	Gibco [®] , Life Technologies GmbH, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (10.000 I.E. Penicillin G/mL; 10 mg Streptomycin/mL)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA-Lösung (10x) (5 mg/mL Trypsin; 2,2 mg/mL EDTA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

3.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Collagenase Typ II (397U/mg)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
DNase I (>600 mAU/mL)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Proteinase K (min. 3000 U/mg)	Qiagen GmbH, Hilden

3.1.4 Spezialchemikalien für Immunhistochemie

Kit	Hersteller
In situ cell death detection kit, POD	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Cell proliferation kit	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
PCNA staining kit	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Aluminium-Bördelkappe	LABC-Labortechnik Müller & Zillger GbR, Hennef
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Einbettkassette	Bio optica, Mailand, Italien
Filterpapier für Einbettkassette	Biosystems Switzerland AG, Nunningen, Schweiz
Filtrationsvorsätze (0,2 µm Porengröße)	Sartorius AG, Göttingen
Injektionsfläschchen (5 und 10 mL)	LABC-Labortechnik Müller & Zillger GbR, Hennef
Kanüle (0,45 x 12 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Leukosilk®	BSN medical GmbH, Hamburg
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
Paraffin „Typ 6“	Microm International GmbH, Walldorf
Parafilm M®	Bemis Company Inc., Neenah, WI, USA
Pipetten „Corning® Costar® Pipettes®“ (5, 10, 25 und 50 mL)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Spritze: Omnifix®-F (1 mL) und Injekt® (5, 10, 20 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Stericup®-Filtereinheit; 0,22 µm-Filter	Merck KGaA, Darmstadt

Bezeichnung	Hersteller
Uhrglas (Kalk-Soda-Glas, Ø 4 cm)	CARL ROTH GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zellkulturflasche (75 cm ²)	TPP TECHNO PLASTIC PRODUCTS AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale (10 cm ²)	Trasadingen, Schweiz
Zellstofftupfer	Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen	TPP TECHNO PLASTIC PRODUCTS AG, Trasadingen, Schweiz
4-er Multischale für Objektträger, Nunc	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

3.1.6 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Binokular „MZ 95“	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Brutgerät für Eier „BSS 300/ BSS 420“	EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co.KG, Emmendingen
Einbetttschale	Biosystems Switzerland AG, Nunningen, Schweiz
Gewebeeinbettautomat „STP120-3“	Microm International GmbH, Walldorf
Gewebehomogenisator „TissueRuptor [®] “	Quiagen
Kamera „DC 300“	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Kühlplatte „EG1150 C“	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikroskop „DM IL“	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikroskop „DM LB2“	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom „HM 355S“	Microm International GmbH, Walldorf

Bezeichnung	Hersteller
Paraffinausgießstation „EG1150 H“	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Pipetten (0,5 – 10 mL, 10 – 100 mL, 20 – 200 mL, 100 – 1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe „Accu-jet [®] pro“	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Sicherheitswerkbank „HERAsafe [®] “	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Waage „MXX-123“	Denver Instrument, Bohemia, NY, USA
Wasseraufbereiter „Milli-Q synthesis“	Merck KGaA, Darmstadt
Zellkulturbrutschrank „Hera cell 240“	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Zentrifuge „Centrifuge 5702“	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge „Megafuge 2.0“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

3.2 Begriffsdefinitionen

Begriff	Bedeutung
Brutschrank-kontrolleier	Eier, die keine Injektion oder Applikation eines Stoffes erhielten und die von Versuchsbeginn bis Versuchsende liegend im Brutschrank verblieben
Kontrolleier	Eier, die im jeweiligen Versuch mit dem zum untersuchten Stoff passenden Vehikel behandelt wurden
unbehandelte Eier	Eier, die keiner Behandlung unterzogen wurden
DEN-Eier	Eier, die wie im jeweiligen Zusammenhang beschrieben mit DEN behandelt wurden
X mg DEN	am Versuchstag 0 Injektion von x mg DEN
DEN+DMSO	am Versuchstag 0 Injektion von 2 mg DEN und am Versuchstag 8 Injektion von DMSO
DEN+(x mg)SF	am Versuchstag 0 Injektion von 2 mg DEN und am Versuchstag 8 Injektion von x mg Sorafenib (in DMSO)
DEN+NaCl	am Versuchstag 0 Injektion von 2 mg DEN und am Versuchstag 20 Injektion von NaCl
DEN+(x mg)CP	am Versuchstag 0 Injektion von 2 mg DEN und am Versuchstag 20 Injektion von x mg Cisplatin (in NaCl)
Extrafokales Lebergewebe	Lebergewebe in DEN-Gruppen, welches nicht als Tumorstufe oder Tumor definiert wurde
H ₂ O	Wasser aus dem Wasseraufbereiter „Milli-Q synthesis“

3.3 Umgang mit Puteneiern bzw. Putenembryonen

Die benötigten Puteneier wurden von Thole Geflügelzucht GmbH in Bösel bezogen. Nach Ankunft wurden die Eier mit einer hellen Lichtquelle durchleuchtet und auf Beschädigungen überprüft. Unbeschädigte Eier wurden anschließend mit Bleistift fortlaufend nummeriert und gewogen. Um die interindividuelle Varianz zu vermindern, wurden Eier aussortiert, deren Gewicht mehr als 10 % vom Durchschnittsgewicht abwich. Bis zur Verwendung wurden die Eier für maximal sieben Tage im Kühlraum bei 6° C aufbewahrt.

3.3.1 Brutbedingungen

Während des Experiments wurden die Eier in einem Brutschrank bei einer Temperatur von $37,5 \pm 0,5$ °C und einer relativen Luftfeuchte von 65 ± 10 % inkubiert. Die Eier lagen auf sich drehenden Schienen in Schubkästen und wurden automatisch alle 6 h gedreht. War eine Verlagerung der Chorio-Allantois-Membran (CAM) nötig befanden sich die Eier auf Papphorden stehend in den jeweiligen Einschüben des Brutschrankes. Eier der gleichen Versuchsgruppe eines Experiments wurden möglichst gleichmäßig auf die Einschübe im Brutschrank verteilt und innerhalb eines Schubkastens bzw. einer Papphorde nicht gruppiert. Einschübe mit liegenden Eiern wurden werktags alle zwei Tage im Brutschrank untereinander getauscht um eine eventuelle Ungleichverteilung der Temperatur oder der relativen Luftfeuchte im Schrank auszugleichen. Daneben wurden werktags alle zwei Tage die Temperatur und die relative Luftfeuchte überprüft und dokumentiert.

3.3.2 Überprüfung der Embryonen auf Vitalität

Zur Überprüfung der Vitalität der Embryonen wurden die Eier in einem verdunkelten Raum mit einer starken Lampe durchleuchtet (Schieren). Bei sich regelrecht entwickelnden Embryonen zeigen sich Blutgefäße in der Eihaut.

In Eiern, die nur Dotter und keine extraembryonalen Blutgefäße aufwiesen, hatte sich kein Embryo entwickelt. In Eiern, bei denen sich vorher entstandene extraembryonale Blutgefäße von der Eischale gelöst hatten, war der Embryo abgestorben. Diese Eier wurden aussortiert und verworfen.

3.3.3 Verabreichung der verwendeten Lösungen

3.3.3.1 Injektion ins Eiklar

Als Vorbereitung wurde das Ei mit der stumpfen Seite nach oben in eine Papphorde gelegt. Die Injektion einer Lösung ins Eiklar erfolgte am apikalen Ende des Eies, ca. 2 cm vom Eiende entfernt. Die betreffende Stelle wurde mit einem Bleistift durch ein „X“ markiert, mit einem mit 70%igem Ethanol getränktem Tupfer desinfiziert und mit einer desinfizierten spitzen Schere ein kleines Loch gestochen. Soweit nicht anders beschrieben wurden jeweils 100 µL Lösung pro Ei injiziert. Die Lösung wurde mit einer Einmalspritze und Einmalkanüle langsam und möglichst gleichmäßig injiziert.

Anschließend wurde die Injektionsstelle mit einem Streifen durchsichtigen Klebebandes versiegelt. Erfolgte eine zweite Injektion zu einem späteren Zeitpunkt, wurde die gleiche Injektionsstelle benutzt. Dazu wurde diese mit einem mit 70%igem Ethanol getränkten Tupfer desinfiziert. Die Spitze wurde durch das Klebeband gestochen, das Loch anschließend mit einem Tupfer abgewischt und mit einem weiteren Streifen durchsichtigen Klebebandes zugeklebt.

3.3.3.2 Applikation auf die Chorio-Allantois-Membran

Für Lösungen, die über die Chorio-Allantois-Membran (CAM) appliziert werden sollten, erfolgte eine CAM-Verlagerung. Der Versuchstag richtete sich nach dem jeweiligen Versuchsprotokoll (siehe Kapitel 3.4.3.2). Dabei wurden die Eier auf ihre Vitalität überprüft und anschließend mit dem apikalen Ende nach oben aufgestellt, um die Luftblase dorthin zu verlagern. Am darauf folgenden Tag wurde das apikale Ende mit einem mit 70%igem Ethanol getränkten Tupfer desinfiziert und dort mit einer spitzen Schere ein kleines Loch gestochen, welches anschließend mit Leukosilk[®] zugeklebt wurde. Hierdurch sollte eine eventuell noch nicht abgesenkte CAM von der Eischale gelöst und ein Absinken ermöglicht werden.

Zur Freilegung der CAM wurde am entsprechenden Versuchstag mit einer spitzen Schere ausgehend von dem vorher gestochenen Loch eine Öffnung mit einem Durchmesser von etwa 1 cm in die Eischale geschnitten. Nach der Applikation einer Lösung wurde die Öffnung mit einem Uhrglas abgedeckt und dieses rundum mit Leukosilk[®] am Ei befestigt. Soweit nicht anders beschrieben, wurde vorsichtig 1 mL Lösung auf die CAM geträufelt.

3.3.4 Leberpräparation

Am Tag des Versuchsendes wurde das Ei aufgeschnitten und der Embryo auf Vitalität überprüft. Tote Embryonen wurden verworfen. Vitale Embryonen wurden umgehend dekapitiert, gewogen und die Leber entnommen. Die Lebern wurden gewogen und anschließend in einem Zentrifugenröhrchen mit ~45 mL 10%iger neutral gepufferter Formalinlösung (= 4 % Formaldehyd) bei 6° C mindestens drei, maximal fünf Tage fixiert.

3.3.5 Aufbereitung der Lebern für die Histologie und Histochemie

3.3.5.1 Einbettung der Lebern

Nach der Fixierung wurden die Leberlappen mit einer Schere voneinander getrennt. Sie wurden in eine mit Filterpapier ausgelegte Einbettkassette überführt. Die Einbettkassette war mit der entsprechenden Einummer beschriftet. Anschließend wurden diese in einen Gewebereinbettautomaten überführt. In diesem wurden die Leberlappen in mehreren Schritten entwässert und in Paraffin überführt. Dies folgte dem nachstehenden Protokoll.

Zeit	Substanz
bis Programmstart	4 % Formaldehyd
1,5 h	70% Ethanol
1,5 h	80% Ethanol
1,5 h	96% Ethanol
3x je 1,0 h	100% Ethanol
2x je 1,5 h	Clear Rite 3
2,0 h	Paraffin
bis Entnahme	Paraffin

Nachfolgend wurden die Leberlappen in Paraffin eingebettet. Dazu wurden Einbettchalen unter Verwendung einer Paraffinausgießstation mit Paraffin befüllt. Die beiden Leberlappen wurden so hineingelegt, dass die großen Flächen als spätere Schnittebenen zur Verfügung standen und die Leberhälften wie *in vivo* angeordnet waren.

3.3.5.2 Schneiden der Lebern

Für die histologischen Untersuchungen wurden aus den Leber-Paraffinblöcken am Mikrotom Leberschnitte angefertigt. Bei den Versuchen zur Dosisfindung wurde etwa von der Mitte der Leber ein Objektträger mit je zwei Schnitten angefertigt. Bei Versuchen zur Untersuchung von Effekten anti-tumoraler Wirkstoffe wurden mehrere Schnittebenen analysiert. Hierfür wurden zum Durchführen verschiedener Färbungen pro Schnittebene je fünf Objektträger mit je zwei Schnitten angefertigt. Die Gewebeschnitte wiesen eine Dicke von 4 µm auf. Zwischen zwei Schnittebenen wurden 0,5 mm Gewebe (10 Schnitte á 50 µm) verworfen. Die Anzahl der Schnittebenen

variierte nach Dicke der Leber. Im Versuch DS 1 beispielsweise wurden in der Regel fünf Schnittebenen erhalten. Die erhaltenen Leberschnitte wurden auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Objekte wurden mindestens über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend gefärbt oder bei Raumtemperatur in Präparatekästen aufbewahrt.

3.3.5.3 Vorbereitung zu färbender Objektträger

Die zu behandelnden Objektträger wurden in Einsätze für Färbetröge gestellt. Sie verblieben etwa 2 h bei circa 60° C im Wärmeschrank, um überflüssiges Paraffin abtropfen zu lassen.

3.4 Methodenentwicklung

3.4.1 Allgemeiner Versuchsablauf

Vor Beginn des Experiments verblieben die Eier zum Anwärmen für etwa 2 h bei Raumtemperatur. Soweit nicht anders beschrieben wurden auch Eier zur Überprüfung der Brutschrankbedingungen (Brutschrankkontrolleier) eingelegt. Diese wurden keiner Behandlung unterzogen und lagen über den gesamten Versuchszeitraum im Brutschrank. Am Versuchstag 24 (d24) erfolgte die Beendigung des Experiments. Dabei wurde der Anteil lebender Embryonen erfasst und, wenn nicht anders beschrieben, das Embryogewicht bis auf zwei Nachkommastellen (0,01 g) bestimmt und die Lebern entnommen, gewogen (bis auf zwei Nachkommastellen; 0,01 g) und fixiert. Die Abläufe an den einzelnen Versuchstagen waren abhängig vom Aufbau des Experiments und werden nachfolgend entsprechend beschrieben.

3.4.2 Induktion fokaler hepatozellulärer Veränderungen (FAH)

Unter Verwendung des Protokolls des *in-ovo*-carcinogenicity-assessment-Assays [27] ist die Induktion von Tumorstufen in der embryonalen Putenleber möglich. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Wirkung anti-tumoraler Substanzen auf Tumorstufen in embryonalen Putenlebern bauen darauf auf.

Zur Induktion der Tumorstufen wurde Diethylnitrosamin (DEN) verdünnt mit Wasser verwendet. Das Wasser stammte dabei entweder aus dem Wasseraufbereiter

oder es handelte sich um Aqua ad injectabilia. An Versuchstag 0 wurde die entsprechende Dosis DEN in einem Volumen von 100 μ L bzw. 100 μ L Wasser als Kontrolllösung in die Eier gespritzt. Die etwaige Injektion einer zweiten Dosis DEN (100 μ L) erfolgte am Versuchstag 7. Die Eier wurden während des Versuches einmal geschickt.

Für die DEN-Dosisfindung wurde der Einfluss von DEN auf die Überlebensrate (von Versuchstag 0 bis 24) der Embryonen betrachtet. Auch wurden die Lebern histologisch aufbereitet und mikroskopisch auf Vorkommen von Tumorstufen und Toxizitätszeichen beurteilt. Es wurde die Auswirkung der ein- und zweimaligen Injektion von 2 mg DEN, und der jeweils einmaligen Injektion von 6 mg und 8 mg DEN untersucht.

Daneben wurde getestet, ob sich mit Phenobarbital und 3-Methylcholanthren die Anzahl der FAH steigern lässt. Die Dosen wurden analog vorhergehenden Versuchen der Arbeitsgruppe um Perrone et al. [56] gewählt. Für die Untersuchungen wurden Eiern an Versuchstag 0 Wasser, 2 mg DEN oder 8 mg DEN und an einem späteren Zeitpunkt der Enzymaktivator bzw. die Kontrolllösung injiziert. Phenobarbital wurde in PBS (fertige Lösung) gelöst, das auch als Kontrolllösung diente. Der Einfluss von Phenobarbital wurde mit der Injektion von PBS, 12 mg oder 24 mg Phenobarbital untersucht. In einem ersten Versuch erfolgte die Injektion der Lösungen am Versuchstag 21, in einem zweiten Versuch am Versuchstag 14. 3-MC wurde in DMSO (Kontrolllösung) gelöst. Für die Untersuchung des Effektes von 3-MC wurden DMSO, 2 mg oder 5 mg 3-Methylcholanthren an Versuchstag 21 gespritzt.

Bei Versuchsende wurden die Lebern vitaler Embryonen entnommen und histologisch auf das Vorkommen von FAH untersucht.

3.4.3 Dosisfindung der Tumorthapeutika

3.4.3.1 Dosisfindung Sorafenib

Die Ausgangsdosis für einen Putenembryo wurde aus der therapeutischen Dosis beim Menschen berechnet. Diese liegt bei 800 mg Sorafenib pro Tag. Aus dem Beispielgewicht eines Menschen (70 kg) und dem Durchschnittsgewicht eines Puteneies (95 g) wurde eine entsprechende Dosis von 1,1 mg Sorafenib pro Ei berechnet. Sorafenib lag als p-Toluensulfonat (Tosilat) vor. Dieses wurde in DMSO gelöst. DMSO

diente auch als Kontrolllösung. An Versuchstag 0 wurden unbehandelte Eier in den Brutschrank gelegt. Beim Menschen wird Sorafenib oral verabreicht. Entsprechend dazu wurde die Sorafeniblösung ins Eiklar injiziert. Das Injektionsvolumen der jeweiligen Lösung betrug 100 μL . Als Zeitpunkt der Injektion wurde Versuchstag 8 gewählt. Etwa ab diesem Tag beginnt sich die Leber der Puten zu entwickeln. Die Vitalität der Embryonen wurde vor der Injektion und optional etwa sieben Tage danach überprüft.

Es wurden die Überlebensraten der Embryonen vom Tag der Sorafenib- bzw. DMSO-Injektion bis zum Versuchsende ermittelt. Ebenso wurden stichprobenhaft Lebern aus mit Sorafenib behandelten Eiern entnommen und histologisch untersucht. Abhängig dieser Überlebensrate wurde eine erste Sorafenibdosis für Dosisfindungsstudien an DEN-Eiern gewählt. Als Kriterium der Dosiswahl wurde die Überlebensrate vom Tag der Wirkstoffgabe bis zum Versuchsende herangezogen. Je nach Überlebensrate wurden im nächsten Versuch höhere oder niedrigere Dosen gewählt.

3.4.3.2 Dosisfindung Cisplatin

Die zuerst getestete Cisplatindosis für einen Putenembryo wurde abhängig von der therapeutischen Dosis beim Menschen errechnet. Die Dosierung von Platinverbindungen wird über die Körperoberfläche berechnet. Für Cisplatin wird eine Einmalgabe in mehrwöchigem Abstand mit einer Maximaldosis von 120 mg Cisplatin/ m^2 Körperoberfläche empfohlen [50]. Ausgehend von einem Modellmenschen mit einer Größe von 1,73 m und dem Gewicht von 58 kg ergab sich die Dosis von 200,34 mg. Für ein Putenei mit dem durchschnittlichen Gewicht von 95 g ergab sich die entsprechende Dosis von 0,33 mg Cisplatin pro Ei. Die Stammlösung (1 mg/mL) wurden mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt, die auch als Kontrolllösung diente. Beim Menschen werden Platinverbindungen intravenös verabreicht. In der vorliegenden Arbeit wurden die jeweiligen Lösungen am Versuchstag 20 in einem Volumen von 2 mL auf die CAM des Puteneies pipettiert.

Unbehandelte Eier wurden an Versuchstag 0 in den Brutschrank gelegt. An Versuchstag 10 startete die CAM-Verlagerung. An Versuchstag 12 wurde eine Öffnung in die Eischale geschnitten und diese mit einem Uhrglas bedeckt. Das Uhrglas wurde rundherum mit Leukosilk[®] am Ei befestigt. An Versuchstag 20 erfolgte die Cisplatin- bzw. NaCl-Applikation auf die CAM vitaler Embryonen. Dazu wurden die Leukosilk[®]-Streifen so durchgeschnitten, dass das Uhrglas hochgeklappt werden konnte.

Anschließend erfolgten die Aufgabe der Lösung und das erneute Verschließen des Uhrglases. Es wurden die Überlebensraten der Embryonen vom Tag der Lösungsapplikation bis zum Versuchsende ermittelt. Auch wurden stichprobenhaft Lebern der Embryonen, die mit der Cisplatinlösung behandelt wurden, entnommen und histologisch untersucht.

Abhängig dieser Überlebensraten, wurde eine erste Dosis Cisplatin für Dosisfindungsstudien an DEN-Eiern gewählt. Die Eier wurden an Versuchstag 9 aufgestellt und an Versuchstag 10 gelocht. An Versuchstag 20 erfolgten die Öffnung der Eischale, das Aufbringen der jeweiligen Lösung und das Verschließen mittels eines Uhrglases. Als Kriterium der Dosiswahl wurde die Überlebensrate vom Tag der Wirkstoffgabe bis zum Versuchsende herangezogen. Je nach Überlebensrate wurden im nächsten Versuch höhere oder niedrigere Dosen gewählt.

3.4.4 FAH-Induktion und Behandlung mit Sorafenib bzw. Cisplatin

Die Übersicht der Schritte während der Versuchsdurchführung zur Induktion fokaler hepatozellulärer Veränderungen und anschließender Behandlung mit Sorafenib bzw. Cisplatin sind in Abbildung 3 vereinfacht dargestellt.

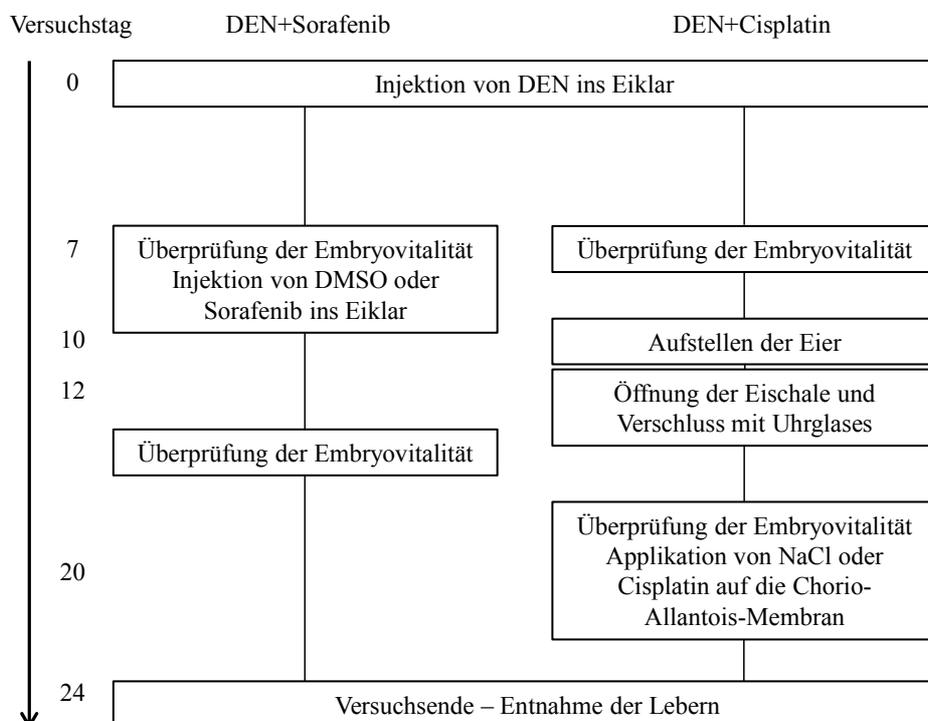


Abb. 3: Übersicht der Versuchsdurchführung zur Induktion fokaler hepatozellulärer Veränderungen und anschließender Behandlung mit Sorafenib bzw. Cisplatin

3.4.5 Histologische und histochemische Methoden

3.4.5.1 Bromdesoxyuridin-Färbung

Mit Hilfe des „Cell proliferation kit“ kann replizierende DNA in proliferierenden Zellen sichtbar gemacht werden. Hierbei wird das Thymidinanalogon 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) in die replizierende DNA eingebaut. Um den konkurrierenden Einbau von endogenem Thymidin in replizierende DNA zu vermindern, beinhaltet das Reaktionsgemisch den Thymidilatsynthase-Inhibitor 5-Fluor-2-desoxyuridin. BrdU wird im weiteren Verlauf durch einen monoklonalen murinen Anti-BrdU-Antikörper vom Isotyp IgG2a gebunden. Die Bindung des Antikörpers an BrdU wird durch simultane Nuklease-Behandlung ermöglicht. IgG2a wird von einem Anti-IgG2a Antikörper gebunden, der mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Endogene Peroxidasen wurden in einem dem gesamten Reaktionsablauf vorausgehenden Schritt durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid blockiert. Idealerweise oxidiert auf diese Weise nur die Antikörper-gekoppelte Peroxidase das anschließend zugesetzte Diaminobenzidin in Gegenwart von Kobalt und Nickel. Es entsteht ein blau-schwarzer Niederschlag der in DNA eingebautes BrdU sichtbar macht.

Verwendete Lösungen

- 0,1 M PBS-Puffer: 14,38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 5,84 g NaCl wurden in 1 L H_2O gelöst; pH=7,4
- 10 mM Citratpuffer: 21 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Lösung A) und 2,94 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Lösung B) wurden je in 1 L H_2O gelöst. Für 1 L Citratpuffer wurden 18 mL Lösung A und 82 mL Lösung B mit 900 mL H_2O aufgefüllt; pH=6
- 50 mM Phosphatpuffer: 5,75 g Na_2HPO_4 und 1,48 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 1 L H_2O gelöst; pH=7,4

BrdU-Markierung

Diese Methode wurde zuerst an unbehandelten Eiern getestet. Für die CAM-Verlagerung wurden die Eier ab Versuchstag 10 stehend im Brutschrank gelagert. In einem weiteren Versuch wurden Eier verwendet, die an Versuchstag 0 und 7 je 2 mg DEN injiziert bekommen hatten. Diese Eier wurden ab Versuchstag 9 stehen im Brutschrank inkubiert.

Die dem Kit enthaltene Markierungslösung ist eine wässrige Lösung, die 5-Brom-2-desoxyuridin in einer Konzentration von 3 mg/mL enthält. Diese Lösung wurde am Versuchstag 24 (Versuchsende) unverdünnt auf die CAM aufgebracht. Es erfolgte der Test verschiedener Volumina und Inkubationszeiten. Anschließend wurde der Embryo umgehend dekapitiert, die Leber entnommen, fixiert und eingebettet.

Immunzytochemische Detektion von BrdU

Es wurde etwa von der Mitte der in Paraffin eingebetteten Leber Schnitte mit 4 µm Dicke angefertigt. Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte die Färbung bei Raumtemperatur in Färbeküvetten nach folgendem Protokoll.

	Zeit	Substanz und Vorgehen	Schritt
	5 min	Clear Rite 3	Entparaffinieren
2x	3 min	100 % EtOH	
je	3 min	96 % EtOH, 80 % EtOH, 70 % EtOH	
	5 min	PBS	Spülen
3x	3 min	Citratpuffer; Kochen in Mikrowelle; anschließend abkühlen lassen	Antigen-demaskierung
3x	3 min	PBS	Spülen
	20 min	0,3 % H ₂ O ₂ in MeOH	Blockierung der endogenen Peroxidase
3x	3 min	PBS	Spülen
	1 h	pro Schnitt 100 µL Nuclease/anti-5-Brom-2-desoxyuridin-Antikörper; Inkubation in feuchter Kammer	1. Antikörper
3x	3 min	PBS	Spülen
	über Nacht, 4° C	pro Schnitt 100 µL Peroxidase-anti-Maus-IgG2a; Inkubation in feuchter Kammer	2. Antikörper
3x	3 min	PBS	Spülen
	10 min	DAB-Lösung (1 mL DAB und 50 mL Phosphatpuffer); Inkubation in Küvette	Konvertierung
	3 min	H ₂ O	Spülen
	10 sec	Hämatoxylinlösung	Gegenfärbung
	1 min	Leitungswasser	

Zum Entwässern wurden die Einsätze der Färbetröge nacheinander für jeweils 5 sec in 70 %, 80 %, 96 % und 100 % EtOH getaucht und dabei etwas auf und ab bewegt. Anschließend für je 10 sec in 100 % EtOH und dreimal in Clear Rite 3. Abschließend wurden die Objekte mit Eukitt eingedeckt.

3.4.5.2 Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen-Färbung

Das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) spielt als DNA umgreifendes Protein eine Rolle bei der DNA-Replikation. Unter Verwendung des PCNA-Färbungskits (PCNA staining kit) kann das PCNA sichtbar gemacht werden. Im Rahmen dieser Methode bindet ein biotinylierter muriner Antikörper PCNA sich teilender Zellen. Anschließend bindet mit einer Peroxidase konjugiertes Streptavidin an das Biotin. Die Peroxidase kann das anschließend zugesetzte Diaminobenzidin in sich teilenden Zellen zu einem braunen Präzipitat oxidieren.

Verwendete Lösungen

0,1 M PBS-Puffer: 14,38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 5,84 g NaCl wurden in 1 L H_2O gelöst; pH=7,4

10 mM Citratpuffer: 21 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Lösung A) und 2,94 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Lösung B) wurden je in 1 L H_2O gelöst. Für 1 L Citratpuffer wurden 18 mL Lösung A und 82 mL Lösung B mit 900 mL H_2O aufgefüllt; pH=6

Ablauf

Es wurde etwa von der Mitte der in Paraffin eingebetteten Leber Schnitte mit 4 μm Dicke angefertigt. Soweit nicht anders beschrieben, wurde der PCNA-Nachweis bei Raumtemperatur in Färbeküvetten nach folgendem Schema durchgeführt.

	Zeit	Substanz und Vorgehen	Schritt
3x	5 min	Clear Rite 3	Entparaffinieren
2x	3 min	100 % EtOH	
je	3 min	96 % EtOH, 80 % EtOH, 70 % EtOH	
	5 min	PBS	Spülen
3x	3 min	Citratpuffer; Kochen in Mikrowelle; anschließend abkühlen lassen	Antigen-demaskierung

	Zeit	Substanz und Vorgehen	Schritt
3x	3 min	PBS	Spülen
	10 min	3 % H ₂ O ₂ in H ₂ O	Blockierung der endogenen Peroxidase
3x	3 min	PBS	Spülen
	10 min	pro Schnitt 100 µL Blockierungslösung; Inkubation in feuchter Kammer	Serumblockierung
	1 h	pro Schnitt 100 µL Maus-anti-PCNA-Antikörper; Inkubation in feuchter Kammer	1. Antikörper
3x	3 min	PBS	Spülen
	10 min	pro Schnitt 100 µL Streptavidin-Peroxidase	2. Antikörper
	5 min	pro Schnitt 100 µL DAB-Lösung DAB-Lösung ablaufen lassen	Konvertierung
	2 min	pro Schnitt 100 µL Hämatoxylinlösung	Gegenfärbung
	1 min	Leitungswasser	
	30 sec	PBS	

Zum Entwässern wurden die Einsätze der Färbetröge nacheinander für jeweils 5 sec in 70 %, 80 %, 96 % und 100 % EtOH getaucht und dabei etwas auf und ab bewegt. Anschließend für je 10 sec in 100 % EtOH und dreimal in Clear Rite 3. Abschließend wurden die Objekte mit Eukitt eingedeckt.

3.4.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Leberschnitte wurden nach Anwendung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf Veränderungen hin untersucht. Hämatoxylin färbt als basisches Hämalan saure Strukturen blau, z. B. Zellkerne. Eosin färbt basische Strukturen, beispielsweise Zellplasmaproteine, rot.

Verwendete Lösungen

Hämatoxylinlösung: fertige Lösung (Hämatoxylinlösung nach Gill 3); wurde vor Erstgebrauch filtriert und für 10 Färbungen verwendet; Lagerung im Dunkeln bei RT

Eosinlösung: 3 g Eosin G (gelblich) wurden in 400 mL 70%igem EtOH unter Rühren gelöst, anschließend filtriert und mit 2 mL Essigsäure versetzt; Gebrauch maximal 10 Mal; Lagerung im Dunkeln bei RT

0,8 % Essigsäure: 1,6 mL Eisessig wurden in 200 mL H₂O gegeben; Lösung wurde bis zu dreimal pro Tag verwendet

EtOH-Lösungen: 100%iger EtOH wurde mit dem entsprechenden Anteil H₂O verdünnt

Ablauf

Die Färbung der Schnitte erfolgte bei Raumtemperatur gefärbt. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte mit Einsätzen für Färbetröge zweimal je 5 min in Clear Rite 3 getaucht. Dann erfolgte die Rehydrierung. Die Schnitte wurden zweimal je 3 min in 100 % EtOH und anschließend je 3 min in 96 %, 80 % und 70 % EtOH getaucht. Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Zeit	Substanz	Schritt
5 min	H ₂ O	
1 min	Hämatoxylinlösung	Kernfärbung
1 min	H ₂ O	
1 min	0,8 % Essigsäure	
1 min	H ₂ O	
2x 1 min	lauwarmes Leitungswasser	
1 min	70 % EtOH	Differenzieren
1 min	Eosinlösung	
		Zytoplasmafärbung

Zum Entwässern wurden die Einsätze der Färbetröge nacheinander für jeweils 5 sec in 70 %, 80 %, 96 % und 100 % EtOH getaucht und dabei etwas auf und ab bewegt.

Anschließend für je 10 sec in 100 % EtOH und dreimal in Clear Rite 3. Abschließend wurden die Objekte mit Eukitt eingedeckt.

3.4.5.4 TUNEL-Assay

Mit Hilfe des TUNEL-Assays können apoptotische Zellen sichtbar gemacht werden. Die Durchführung erfolgte unter der Verwendung des „In situ cell death detection kit, POD“. Während der Apoptose kommt es zu zahlreichen Doppelstrangbrüchen in der DNA und zu freiliegenden Hydroxygruppen. An diesen Stellen werden während des Assays Fluorescein-markierte Nukleotide durch die terminaler Desoxyribonukleotidyltransferase eingebaut. An diese Nukleotide wird im weiteren Verlauf ein anti-Fluorescein Antikörper, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist, angehängt. Endogene Peroxidase wurden in einem vorhergehenden Schritt blockiert. In Zellen, die die zugegebene Peroxidase enthalten, kann das zugesetzte Diaminobenzidin im folgenden Schritt zu einem unlöslichen braunen Substrat umgesetzt werden. Die Zellen wurden anschließend mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Verwendete Lösungen

0,1 M PBS-Puffer:	14,38 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 2,62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 5,84 g NaCl wurden in 1 L H_2O gelöst; pH=7,4
50 mM Tris-Puffer:	7,88 g Tris-HCl, und 8,77 g NaCl wurden in 1 L H_2O gelöst; pH=7,6
Tris-Puffer für DNase:	2,43 g Tris-Base und 0,407 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 500 mL H_2O gelöst; pH=7,5
DNase-Lösung:	1 mg DNase I wurde in 500 μL Tris-Puffer gelöst; Zugabe von 500 mg Glycerin; Lagerung bei -20°C
DAB-Lösung:	1 DAB-Tablette wurde in 15 mL Tris-Puffer gelöst, filtriert und aliquotiert (je 1 mL); Lagerung bei -20°C ; vor Verwendung auftauen und Zugabe von 1,5 μL H_2O_2 pro Aliquot

Ablauf

Für den Apoptosenachweis wurde jeweils der Objektträger verwendet, der im Serienschnitt auf den HE-gefärbten Objektträger folgte. Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte die Reaktion in Färbetrögen. Wurde die Lösung direkt auf den

Schnitt getropft, wurde der Objektträger vorsichtig mit einem Stück Parafilm abgedeckt, um die Lösung gleichmäßig zu verteilen und eventuelles Verflüchtigen der Lösung zu verhindern. Der Assay wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

	Zeit	Substanz und Vorgehen	Schritt
3x	5 min	Clear Rite 3	Entparaffinieren
2x	3 min	100 % EtOH	
je	3 min	96 % EtOH, 80 % EtOH, 70 % EtOH	
3x	3 min	PBS	Spülen
	20 min	0,3 % H ₂ O ₂ in MeOH	Blockierung der endogenen Peroxidase
3x	3 min	PBS	Spülen
	15 min 30° C	Proteinase K in PBS (20 µg/mL); pro Schnitt 50 µL; Inkubation in feuchter Kammer	Demaskierung
3x	3 min	PBS	Spülen
	60 min 37° C	pro Schnitt 50 µL TUNEL- Reaktionsmix; Inkubation in feuchter Kammer	Nukleotideinbau
3x	3 min	PBS	Spülen
	30 min 37° C	pro Schnitt 50 µL DAB-Lösung; Inkubation in feuchter Kammer	Konvertierung
2x	3 min	PBS	Spülen
	3 min	H ₂ O	Spülen
	10 sec	Hämatoxylinlösung	Gegenfärbung
	5 sec	H ₂ O	
	10 sec	H ₂ O	
	1 min	0,8 % Essigsäure	
	1 min	H ₂ O	
	5 min	fließendes lauwarmes Leitungswasser	Differenzieren

Zum Entwässern wurden die Einsätze der Färbetröge nacheinander für jeweils 5 sec in 70 %, 80 %, 96 % und 100 % EtOH getaucht und dabei etwas auf und ab bewegt.

Anschließend für je 10 sec in 100 % EtOH und dreimal in Clear Rite 3. Abschließend wurden die Objekte mit Eukitt eingedeckt.

In jedem Versuch wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle wurde vor der Behandlung mit dem TUNEL-Reaktionsmix für 10 min mit DNase in einer feuchten Kammer inkubiert. Hierfür wurde DNase-Lösung 1:5 mit Tris-Puffer (50 mM) verdünnt und 100 µL hiervon auf den Schnitt getropft. Die Negativkontrolle wurde statt mit TUNEL-Reaktionsmix mit 50 µL Markierungslösung (aus Kit) behandelt.

3.5 Analyse der histologisch und histochemisch aufbereiteten Schnitte der embryonalen Putenleber

3.5.1 Mikroskopie und Bildaufnahme

Zellkulturschalen wurden an einem inversen Mikroskop betrachtet. Die Untersuchung der Leberschnitte erfolgte an einem Auflichtmikroskop. Für die Bestimmung der Schnittgröße eines Präparates wurde ein Binokular benutzt. Unter Verwendung einer Kamera und dazugehöriger Software (Leica „DCTwain V5.1.10“ und Leica „QWin Lite V2.8“) konnten Bilder aufgenommen werden, die die Grundlage weiterer Analysen bildeten.

Es wurde der technisch beste Schnitt des jeweiligen Objektträgers ausgewählt. Dieser sollte gleichmäßig gefärbt und gleichmäßig dick sein, keine oder möglichst wenig Färbeartefakte aufweisen und eine gute Strukturhaltung zeigen. Insgesamt wurde auf eine vergleichbare Schnittdicke der Probengesamtheit geachtet.

Für Übersichts- und Detailaufnahmen fokaler hepatozellulärer Veränderungen bzw. von extrafokalem Gewebe wurden Schnitte verwendet, die durch Hämatoxylin und Eosin angefärbt worden waren. Bei einer 100fachen Vergrößerung wurde der Schnitt mäanderförmig auf fokale hepatozelluläre Veränderungen (FAH) hin untersucht. FAH wurden bei einer 40fachen Vergrößerung fotografiert, benannt und die Anschnittfläche mit Hilfe der zur Kamera gehörenden Software vermessen. Wenn der FAH nicht in den Bildausschnitt passte, wurde eine 25fache Vergrößerung verwendet. Für Detailaufnahmen eines FAH wurden bei einer 400fachen Vergrößerung ausgehend von

einem Punkt mäanderförmig Bilder des gesamten FAH aufgenommen. Das Weiterschieben des Schnittes erfolgte dabei jeweils um genau ein Gesichtsfeld.

In Lebern, die Embryonen der DEN-Gruppen entstammen, wurden FAH erwartet. Von einer Leber wurden in oben beschriebener Weise stichprobenhaft Schnitte angefertigt. Fokale hepatozelluläre Veränderungen (FAH) waren durch die HE-Färbung detektierbar. Das Gewebe einer Leber wurde in fokales Gewebe und extrafokales Gewebe unterschieden. So enthält ein Schnitt einer Leber mit detektierten FAH-Anschnitten gleichzeitig fokales und extrafokales Gewebe, während ein anderer Schnitt der gleichen Leber keinen FAH-Anschnitt aufweist und folglich nur extrafokales Gewebe darstellt.

Die Möglichkeit, dass trotz nicht sichtbarer FAH-Anschnitte in den analysierten Schnitten einer Leber FAH in der Leber vorhanden sind, wurde angenommen. Dieses Gewebe wurde demnach auch als extrafokales Lebergewebe bezeichnet.

Für die Auswertung des extrafokalen Gewebes wurden ausgehend von einem beliebigen Punkt des Schnittes mäanderförmig mindestens 40 Bilder bei einer 400fachen Vergrößerung aufgenommen. Das Weiterschieben des Schnittes erfolgte vertikal um ein Gesichtsfeld und nach Erreichen des Schnittendes horizontal um zwei Gesichtsfelder. Randregionen wurden dabei ausgespart.

Mit Hilfe des Programmes Photoshop (Adobe „Photoshop CS5“ Version 12.0) wurden die Detailaufnahmen mit einem Gitternetz aus 25 gleich großen Kästchen (Planquadrate) überlagert. Diese diente als Orientierungshilfe beim Auszählen der Mitosen und Zellkerne. Die Fläche eines Planquadrates betrug $979,8 \mu\text{m}^2$.

Die Vermessung des ausgewerteten Schnittes erfolgte unter Verwendung des Binokulars. Bei einer Vergrößerung von 6,3 wurde ein Bild aufgenommen und dieses mit Hilfe der zur Kamera gehörenden Software vermessen.

3.5.2 Beurteilung des fokalen bzw. extrafokalen Lebergewebes

Unter dem Mikroskop wurde ein FAH auf ausgewählte Merkmale hin analysiert. Es wurde beurteilt wie basophil und eosinophil das Zytoplasma des FAH in Relation zum direkt umliegenden Gewebe erschien und das Vorhandensein von tubulären Strukturen innerhalb des FAH erfasst. Zudem wurde die Pleomorphie der Zellkerne, d. h. wie stark unterschiedlich sie waren, beurteilt. Ebenso wurde die Abweichung der Form der

Zellkerne innerhalb des FAH von Zellkernen aus Kontrollgewebe bewertet (als atypische Nuklei bezeichnet). Es wurde weiterhin charakterisiert, wie stark der FAH umliegendes Gewebe komprimierte. Um zu beschreiben inwieweit ein Merkmal ausgeprägt war, wurden die Zahlen 0 bis 3 verwendet. Die Angabe „0“ bedeutete dabei, dass das Merkmal nicht vorhanden war – die Angabe „3“, dass es stark ausgeprägt war.

Als extrafokales Gewebe wurde alles Lebergewebe in DEN-Gruppen bezeichnet, was nicht als FAH definiert wurde. Es wurde in allen Versuchen auf das Vorhandensein von Nekrosen hin betrachtet. Zudem wurden bei Diethylnitrosamin-Dosisfindungsstudien tubuläre Veränderungen und das Ausmaß von Megalozyten beurteilt.

3.5.3 Morphometrische Quantifizierung der FAH

Jeder FAH und jeder dafür ausgewertete Leberschnitt wurde, wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, vermessen. Der verlässlichste Parameter der morphometrischen Auswertung der FAH war der Flächenanteil, den FAH vom Lebergewebe ausmachten. Hierbei wurde der jeweilige FAH mit dem jeweils betrachteten Leberschnitt in Beziehung gesetzt. Etwaiges unterschiedlich starkes Schrumpfen der Lebern während der verschiedenen Durchgänge der Leberfixierung kann dabei vernachlässigt werden. Für jeden Embryo in einer Versuchsgruppe wurde errechnet wie viel Fläche FAH in 1 mm² ausgewerteter Leberfläche vorkam. Hierfür wurde der Quotient aus der Summe der Anschnittflächen aller FAH der untersuchten Leber und der Summe der Fläche aller ausgewerteten Schnitte der untersuchten Leber gebildet. Anschließend wurde berechnet wie viel Fläche FAH [μm^2] in 1 mm² Lebergewebe es durchschnittlich gab. Kam kein FAH in der untersuchten Leber vor, war der Wert gleich Null. Die Werte der aller Embryonen (untersuchten Lebern) wurden gemittelt.

Die Anzahl FAH-Anschnitte pro Leberfläche wurde ebenfalls für jeden Embryo ermittelt. Dafür wurde der Quotient aus der Anzahl FAH-Anschnitte der untersuchten Leber und der Summe der Fläche aller ausgewerteten Schnitte der untersuchten Leber errechnet. Kam kein FAH in der untersuchten Leber vor, war der Wert gleich Null. Es wurde der Mittelwert aus den Werten aller Embryonen (untersuchten Lebern) gebildet.

Daneben wurde die durchschnittliche Anschnittfläche der FAH berechnet. Hierfür wurden alle Anschnittflächen der FAH in einer Versuchsgruppe gemittelt.

3.5.4 Klassifikation der FAH

Ausgehend von den Merkmalswerten der FAH-Analyse (siehe Kapitel 3.5.2) wurden die FAH in verschiedene Klassen eingeteilt. Zum einen wurden sie als basophile oder eosinophile FAH klassifiziert, zum anderen wurden sie als das umliegende Gewebe komprimierend oder nicht komprimierend klassifiziert.

3.5.4.1 Einteilung in basophile und eosinophile FAH

Als basophile FAH (BCF) wurden alle FAH klassifiziert, deren Basophilie-Wert $> 0,5$ und größer als der Eosinophilie-Wert war. FAH, deren Eosinophilie-Wert den der Basophilie überwog, wurden in der vorliegenden Arbeit als eosinophile FAH (ECF) klassifiziert. FAH, deren Basophilie- und Eosinophilie-Wert gleich war, wurden zu eosinophilen FAH gruppiert.

3.5.4.2 Einteilung in nicht-komprimierende und komprimierende FAH

Abhängig von der Ausprägung des Merkmals „Kompression des umliegenden Gewebes“, wurde ein FAH als nicht-komprimierend [FAH(nk)] oder komprimierend [FAH(k)] bezeichnet. Bei einem Wert > 0 wurde der FAH als komprimierend klassifiziert.

3.5.5 Analyse von Zellproliferation und Zellverlust im extrafokalen bzw. fokalen Lebergewebe

3.5.5.1 Bestimmung der Zellzahl

Unter Verwendung der aufgenommenen Detailbilder (siehe Kapitel 3.5.1) der HE-gefärbten Leberschnitte wurden Zellkerne bzw. Mitosefiguren der Prometa-, Meta- und Anaphase als Parameter für die Zellzahl des extrafokalen und fokalen Lebergewebes gezählt. Es wurden nur Hepatozyten in die Zählung einbezogen, die in der fokussierten Aufnahmeebene lagen.

Bei Bildern des extrafokalen Lebergewebes wurde pro Bildserie jedes 10. Bild ausgezählt. Bei FAH wurden die zu zählenden Bilder entsprechend der Anzahl aufgenommener Bilder bestimmt. Dabei wurde nach folgendem Schema verfahren:

- 1-2 Bilder: alle Bilder auszählen
- 3-6 Bilder: angefangen bei Bild 1 jedes 2. Bild zählen
- 7-9 Bilder: angefangen bei Bild 2 jedes 2. Bild zählen
- 10-15 Bilder: angefangen bei Bild 3 jedes 3. Bild zählen
- 16-21 Bilder: angefangen bei Bild 4 jedes 4. Bild zählen
- 22-31 Bilder: angefangen bei Bild 5 jedes 5. Bild zählen
- 32-40 Bilder: angefangen bei Bild 6 jedes 6. Bild zählen
- mehr als 40 Bilder: jedes 10. Bild zählen

Falls ein zu zählendes Bild z. B. aufgrund einer unterschiedlich fokussierten Bildebene, Schnittartefakten oder ungewöhnlich viele Gefäßen nicht auszählbar war, wurde das nächste Bild verwendet. Das zu zählende Bild wurde immer ab der ursprünglichen Bildnummer ausgewählt.

Die Anwendung CellCounter des Programmes ImageJ (Version 1.44p) wurde dabei als Zählhilfe benutzt. Lagen Zellkerne auf dem oberen und linken Rand des Bildes bzw. bei Bildern von FAH auf dem oberen und linken Rand der Planquadrate, in denen der FAH vorkam, wurden sie nicht mitgezählt.

Bei der Zellzahlbestimmung innerhalb FAH wurden nur Planquadrate ausgezählt, die vollständig innerhalb des FAH lagen. Die Anzahl gezählter Planquadrate pro Bild wurde notiert und pro FAH die durchschnittliche Anzahl Hepatozyten innerhalb eines Planquadrates berechnet. Es wurde die Zellzahl pro Flächeneinheit und pro FAH errechnet.

3.5.5.2 Bestimmung der Zellproliferation

Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte an den aufgenommenen Detailfotos (siehe Kapitel 3.5.1) der HE-gefärbte Leberschnitte. Es wurden Mitosefiguren der Prometa-, Meta- und Anaphase als Mitose gezählt.

Für die Bestimmung der Zellproliferation in FAH wurde aus allen Detailfotos eines FAH die Gesamtmitosenzahl ermittelt. Durch Division mit der FAH-Anschnittfläche konnte die Anzahl der Mitosen pro Flächeneinheit FAH bestimmt werden. Mit Hilfe der Division der Werte von Mitose pro Flächeneinheit und Zellzahl pro Flächeneinheit

konnte die Anzahl Mitosen pro 1000 Hepatozyten berechnet werden. Für die jeweilige Versuchsgruppe wurde aus den Werten der individuellen FAH die durchschnittliche Zahl Mitosen pro 1000 Hepatozyten in FAH errechnet.

Im extrafokalen Gewebe wurde im ersten Schritt die durchschnittliche Anzahl Mitosen pro Leber ermittelt. Dazu wurde für jeden Objektträger einer Leber die Anzahl Mitosen auf Basis der Detailbilder bestimmt. Nicht repräsentative Bilder wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen. Beispielsweise, wenn mehr als die Hälfte eine schlecht fokussierte Bildebene, Schnittartefakte oder ungewöhnlich viele Gefäßen aufwies. Die überlagerten Planquadrate auf den Bildern dienten als Suchhilfe, denn sie erleichterten das mäanderförmige Anschauen der Bilder zur Identifizierung von Mitosen. Es wurde die durchschnittliche Zahl Mitosen pro Bild und pro Flächeneinheit ermittelt. Mit Hilfe der Division der Werte von Mitose pro Flächeneinheit und Zellzahl pro Flächeneinheit konnte die Anzahl Mitosen pro 1000 Hepatozyten berechnet werden. Aus den ausgewerteten Objektträgern einer Leber wurde der Median gebildet (Mitosen pro 1000 Hepatozyten pro Leber). Aus den Werten der Lebern einer Versuchsgruppe wurde dann der Durchschnittswert Mitose pro 1000 Hepatozyten in einer Versuchsgruppe errechnet.

3.5.5.3 Bestimmung des Zellverlustes

Für die Bestimmung des Zellverlustes wurden Leberschnitte verwendet, die der TUNEL-Reaktion unterzogen worden waren. Die Auszählung TUNEL-positiver Zellen (=Zellverlust) erfolgte direkt unter dem Mikroskop bei einer 400fachen Vergrößerung. Es wurden nur Hepatozyten gezählt. Unter Verwendung der Ergebnisse der Zellkernzählung an Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnitten konnte die Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro 1000 Hepatozyten errechnet werden.

In fokalem Gewebe wurde die Gesamtzahl TUNEL-positiver Zellen innerhalb des FAH-Anschnittes ermittelt. Daraus wurde die Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro 1000 Hepatozyten im FAH errechnet.

Für extrafokales Gewebe wurde zuerst der Zellverlust pro 1000 Hepatozyten in der jeweiligen Leber bestimmt. Dazu wurden in allen Leberschnitten, die der TUNEL-Reaktion unterzogen worden waren, je 10 Gesichtsfelder analysiert. Diese wurden zufällig ausgewählt und entstammten verschiedenen Bereichen des jeweiligen Leberschnittes. Wie der momentan abgebildete Ausschnitt beispielsweise Schnittartefakte oder ungewöhnlich viele Gefäße auf, so wurde ein naheliegender anderer Bereich verwendet. Es wurde ebenso darauf geachtet, dass der Ausschnitt

keinen Teil eines FAH umfasste. Aus den 10 Werten eines Leberschnittes wurde der Mittelwert gebildet. Mit Hilfe der Zellzahl wurde der Zellverlust pro 1000 Hepatozyten des einzelnen Leberschnittes berechnet. Diese Werte einer Leber wurden durch die Berechnung des Medians zusammengefasst. Für die jeweilige Versuchsgruppe wurden die entsprechenden Mediane gemittelt und so die endgültige Anzahl über den Zellverlust pro 1000 Hepatozyten errechnet.

3.5.5.4 Errechnung des Nettowachstums

Für die Berechnung des Wachstums eines Gewebes wurden Zellproliferation und -verlust in Beziehung gesetzt (Nettowachstum). Mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden zur Ermittlung der Zellproliferation mittels HE-Färbung und des Zellverlustes mittels TUNEL-Assay werden unterschiedliche Zeitfenster der jeweiligen Prozesse detektiert d. h. der Zeitraum, in dem eine proliferierende oder untergehende Zelle als solche erkannt werden kann, ist unterschiedlich. Die errechnete Anzahl mitotischer Zellen und TUNEL-positiver Zellen je 1000 Zellen kann deshalb für die Ermittlung des Nettowachstums nicht in direkten Bezug gesetzt werden. Diese wurden daher für einen Zeitraum von 24 h normiert, d. h. zum Vergleich wurde die Anzahl der in 24 h proliferierenden oder untergehenden Zellen je 1000 Zellen verwendet.

Zur Bestimmung der Mitoserate wurden die in der HE-Färbung gut identifizierbaren Mitosefiguren der späten Prometaphase, der Metaphase und der frühen Anaphase gezählt. Als Gesamtzeitraum der Mitose wird im Mittel ein Zeitraum von einer Stunde angegeben [57, 58]. Die Prometa-, Meta- bzw. Anaphase umfassten dabei am Beispiel von Tabakpflanzenzellen 25 min, 35 min bzw. 5 min [59]. In Zellen der Staubblätter der Dreimasterblume wurde die Metaphase mit 33 min und die Anaphase mit 19 min angegeben [60]. In Mausezellen umfasste die Anaphase dagegen nur 4 min [61]. Wir haben davon den Zeitraum, in dem wir Mitosen erfassen, abgeleitet und mit einer Spanne von 45 min angenommen. Ausgehend davon wurde die Anzahl Mitosen pro 24 h berechnet.

Der Zeitraum des Apoptoseprozesses, der unter Verwendung des TUNEL-Assays erfasst wird, ist nicht genau bekannt. Der Gesamtzeitraum der Apoptose von der Initiation bis zur voll ausgeprägten DNA-Fragmentierung kann je nach untersuchten Zellen sehr stark variieren und einen Bereich von 6 bis 24 Stunden umfassen [62]. Die Zeit, bis zu der die apoptotische Zelle völlig verschwunden, d. h. nicht mehr

detektierbar ist, ist *in vitro* länger als *in vivo* [63–65], da die entsprechenden Abräummechanismen für apoptotische Zellen *in vitro* weniger effektiv sind. Im Lebergewebe umfassen die histologisch sichtbaren Apoptoseprozesse einen Zeitraum von nur zwei bis drei Stunden [66, 67]. Dies wird für fokales und extrafokales Gewebe angenommen [66]. Zudem stimmen in apoptotischen Zellen des Lebergewebes histologische Sichtbarkeit der morphometrischen Zelländerungen und Detektion durch den TUNEL-Assay annähernd überein [68, 69]. Wir haben hieraus für unsere Analysen das Zeitfenster TUNEL-positiver Zellen mit 3 Stunden angenommen und daraus die Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro 24 h abgeleitet.

Das Nettowachstum wurde durch die Subtraktion der Anzahl Mitosen pro 24 h und der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro 24 h erhalten. Für das extrafocale Lebergewebe wurde dies pro Embryo und für FAH pro FAH berechnet. Je Versuchsgruppe wurde daraus ein Mittelwert für das Nettowachstum gebildet.

3.5.5.5 Zusammenhang histologischer Parameter und Zellproliferation bzw. Zellverlust innerhalb FAH

Für die FAH-Klassifikation wurden, wie im Kapitel 3.5.2 beschrieben, verschiedene Merkmale der FAH in Zahlen ausgedrückt. Es erfolgte für diese Merkmale eine Prüfung, ob die Ausprägung des Merkmals mit der Höhe der Zellproliferation bzw. des Zellverlustes korreliert ist. Hierfür wurden die FAH ausgehend vom Medianwert des Merkmals in zwei Gruppen eingeteilt. Eine umfasste FAH, deren Parameterwert größer oder gleich des Medians waren und die andere die restlichen FAH. Wenn der Median null betrug, wurde anders verfahren. Eine Gruppe umfasste dann alle FAH, deren Parameterwert gleich null war und die andere Gruppe alle, deren Parameterwert größer null war. Anschließend wurde für beide Gruppen das arithmetische Mittel der Zellproliferations- und Zellverlustrate bestimmt. Aus diesen beiden Werten wurde dann der Quotient ermittelt. Dabei wurde der größere Wert durch den kleineren geteilt. War der Wert in der Gruppe der FAH mit stark ausgeprägtem Merkmal größer, wurde dem Quotient entsprechend „+“-Zeichen zugeordnet. Das „+“ bedeutete dabei, dass mit stärker ausgeprägtem Merkmal die Zellproliferation bzw. der Zellverlust größer war. War der Wert von Zellproliferation bzw. Zellverlust in der Gruppe der FAH mit wenig oder nicht ausgeprägtem Merkmal größer, wurden „-“-Zeichen zugeordnet. Dies ließ darauf schließen, dass mit stärker ausgeprägtem Merkmal Zellproliferation bzw. Zellverlust kleiner war. Bei einem Quotienten geringer als 1,2 wurde angenommen,

dass kein Zusammenhang (k. Z.) zwischen dem Grad der Ausprägung des Merkmals und Zellproliferation bzw. Zellverlust bestand. Bei einem Wert zwischen 1,2 und 1,5 wurde angenommen, dass der Zusammenhang gering war („+“ bzw. „-“). Bei einem Wert zwischen 1,5 und 1,8 wurde ein Zusammenhang vermutet („++“ bzw. „--“). Für Werte größer 1,8 wurde ein starker Zusammenhang angenommen („+++“ bzw. „---“). Die Werte für Basophilie und Eosinophilie wurden hierfür nicht separiert betrachtet. Diese Werte wurden beide verwendet, um einen FAH als basophil oder eosinophil zu klassifizieren.

Dies ist im Folgenden beispielhaft am Merkmal „tubuläre Struktur“ der FAH in DEN+DMSO-Lebern dargestellt. Die Werte sind Tab. 70 (siehe Anhang) entnommen. Der Median der Ausprägung der tubulären Strukturen betrug 0,5. FAH, die in der Klassifikation für das Merkmal „tubuläre Struktur“ einen Wert $\geq 0,5$ hatten, bildeten eine Gruppe. Von diesen FAH wurde die durchschnittliche Zahl Mitosen bzw. TUNEL-positiver Zellen pro 1000 Hepatozyten berechnet. Sie betrug 6,59 bzw. 8,05. Ebenso wurde mit den FAH verfahren, deren „tubuläre Struktur“ einen Wert $< 0,5$ hatte. Für sie ergaben sich im Mittel 5,68 Mitosen bzw. 8,58 TUNEL-positiver Zellen pro 1000 Hepatozyten. Der Quotient bezogen auf Zellproliferation betrug 1,2 und der bezogen auf Zellverlust 1,1. Dies lässt eine geringe Steigerung von Zellproliferation und Zellverlust bei FAH mit tubulärer Struktur im Vergleich zu FAH ohne tubuläre Struktur vermuten.

3.5.6 Analyse der FAH mit stereologischen Berechnungen

Für Untersuchungen in der Krebsentstehung und -therapie sind Aussagen über die quantitative Beurteilung von veränderten Bereichen (z. B. präneoplastischer FAH) hilfreich. Fullman [70], Pugh et al. [71] und Enzmann et al. [72] schlagen Methoden vor, mit denen sich aus gemessenen FAH-Anschnittflächen Rückschlüsse auf die FAH-Anzahl im Gewebe ziehen lassen. Bei der Methode nach Fullman wird eine Formel verwendet, mit der die Anzahl FAH pro Volumeneinheit (N_V ; cm^3) aus der ausgewerteten Fläche (A) und den Radii der einzelnen FAH-Anschnitte (r_i) berechnet werden kann.

$$N_V = \frac{1}{\pi \cdot A} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{1}{r_i}$$

Die Größenverteilung der FAH-Anschnitte wird dabei nicht beachtet. Durch Pugh et al. wurde dieser Ansatz weiterentwickelt, um auch die Größenverteilung der FAH darzustellen. Dies wird durch die Bildung geometrischer Reihen gemildert, wie es Pugh vorschlägt. Hierfür wurden die gemessenen FAH-Anschnittflächen bestimmten Klassen zugeordnet. Die unterste Klassengrenze wurde ausgehend der kleinsten FAH-Anschnittfläche aus der Gesamtheit gemessener FAH-Anschnittflächen gesetzt. Das Doppelte dieser Grenze war die Untergrenze der nächsten Klasse. Die Werte der gemessenen FAH-Anschnittflächen und der Klassengrenzen wurden in Radii umgerechnet. Die gemessenen FAH-Anschnittflächen wurden dann abhängig von ihren Radii den verschiedenen Klassen zugeordnet. Die Klassenbildung wurde fortgesetzt, bis alle FAH-Anschnittflächen auf Klassen aufgeteilt waren, d.h. keine FAH mit größerer Fläche bzw. Radius als die Klassengrenze vorhanden waren. Im untersuchten Probenmaterial betrug die Fläche des kleinsten FAH-Anschnittes $2400 \mu\text{m}^2$. Die Grenzen der Klassen wurden geometrisch steigend auf $2000 \mu\text{m}^2$, $4000 \mu\text{m}^2$, $8000 \mu\text{m}^2$ usw. gesetzt. Die Grenzwerte umgerechnet in Radii betrug entsprechend $25 \mu\text{m}$, $36 \mu\text{m}$, $51 \mu\text{m}$. Die Werte aller Grenzen finden sich im Anhang Tabelle 71. Eine Klasse umfasste alle FAH-Anschnitte, deren Radius größer war als der Grenzwert. Der größte FAH-Anschnitt befand sich in Klasse 1. Für jede Klasse wurde die Anzahl FAH pro Volumeneinheit (cm^3) für FAH-Anschnitte, die einen größeren Radius als die Klassengrenze hatten, nach folgender Formel berechnet:

$$N = \frac{1}{\pi \cdot A} \cdot \sum_{r_i > u} \frac{1}{\sqrt{r_i^2 - u^2}}$$

N ist die Anzahl FAH pro cm^3 , A ist die gesamte ausgewertete Leberfläche, r_i ist der Radius des jeweiligen FAH und u ist die Untergrenze der jeweiligen Klasse.

Diese Berechnung wies eine hohe Varianz auf. Aus diesem Grund wurde, wie von Pugh et al. empfohlen für eine Klasse zwei niedrigere und zwei höhere Werte der Untergrenze angenommen ($0,9u$; $0,95u$; $1,05u$ und $1,1u$). Zum Beispiel betrug die Werte für die Untergrenze der Klasse 10 (Klasse mit den kleinsten FAH): $0,90 u = 22,5 \mu\text{m}$; $0,95u = 23,8 \mu\text{m}$; $1u = 25 \mu\text{m}$; $1,05u = 26,3 \mu\text{m}$ und $1,1u = 27,5 \mu\text{m}$. Für diese wurde ebenfalls die Anzahl FAH pro cm^3 berechnet. Aus diesen fünf N-Werten einer Klasse wurde dann der Median gebildet (N_M ; siehe Anhang Tab. 72). Die letztendliche Anzahl

FAH in einer Klasse berechnete sich aus der Subtraktion der Anzahl FAH in der größeren Klasse mit der Anzahl FAH der nächst kleineren Klasse (N ; siehe Anhang Tab. 72).

Die Berechnung der Anzahl FAH pro cm^3 nach Enzmann et al. beruht auch auf der Einteilung der definierten FAH in Klassen abhängig ihrer Radii. Die Grenzen dazu wurden wie bei der Methode nach Pugh et al. verwendet (siehe Anhang Tab. 71). Nach Enzmann et al. wurde die Anzahl FAH pro Volumeneinheit (cm^3) in einer Klasse (N_n) nach folgender Formel berechnet:

$$N_n = \frac{C_1 \cdot F_n}{2\bar{r}_n} - \frac{1}{\bar{r}_n} \cdot \sum_{i=1}^{n-1} C_{n-i+1} \cdot N_i \cdot \bar{r}_i$$

F_n ist die Anzahl zugeordneter FAH in der Klasse n und r_n ist der Mittelwert aus Ober- und Untergrenze der Radii der Klasse n . C_n ist eine Konstante, die folgendermaßen berechnet wurde:

$$C_n = \frac{\sqrt{3 \cdot 2^{n-1} - 2} - \sqrt{3 \cdot 2^{n-1} - 4}}{\sqrt{2^{n-1}}}$$

Die Werte für die jeweiligen Konstanten finden sich im Anhang Tabelle 73. Die Anzahl FAH pro Flächeneinheit in Klasse 1 (N_1) stellte einen Sonderfall dar. Sie wurde entsprechend der nachstehenden Formel berechnet:

$$N_1 = \frac{C_1 \cdot F_1}{2\bar{r}_1}$$

Der Wert N der jeweiligen Klasse (N_n) wurde abschließend durch die Zahl der gesamten ausgewerteten Leberfläche geteilt. Dies ergab das Endergebnis für die Anzahl FAH pro Volumeneinheit (cm^3) in der jeweiligen Klasse (N_N).

Die drei Methoden wurden für den Versuch mit der höchsten Zahl an FAH verglichen. Für die stereologische Berechnung nach Pugh et al. und nach Enzmann et al. kann aus der Häufigkeit der FAH in den einzelnen FAH-Klassen (Größenverteilung) der Anteil der FAH am Gewebe (Volumenanteil) berechnet werden. Dazu wurde anhand der Radii der Mittelwert der oberen und unteren Grenze einer Klasse gebildet (\bar{r}_i). Mit diesem

wurde dann das mittlere Volumen der FAH in einer Klasse (V_i) nachfolgender Formel berechnet:

$$V_i = \frac{4}{3} (\bar{r}_i)^3$$

Dieser Wert wurde anschließend mit der Anzahl FAH dieser Klasse (N_i) multipliziert. Abschließend wurden die Werte aller Klassen addiert und es ergab sich das Volumen der FAH, die im ausgewerteten Lebergewebe erhalten waren. Die so erhaltenen Werte wurden mit dem tatsächlich gemessenen Flächenanteil der FAH verglichen. Da der Flächenanteil FAH vom ausgewerteten Schnitt gleich dem Volumenanteil im Gewebe ist [Axiom von Delesse, 1847; 73], ist damit eine Auswahl der besten Berechnungsmethode möglich.

3.6 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm SPSS (Version 10.0.7) durchgeführt. Ziel war die Aussage, ob sich die Mittelwerte zweier Versuchsgruppen signifikant unterscheiden. Zuerst wurden die zu analysierenden Werte einer jeweiligen Versuchsgruppe unter Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung hin analysiert. Bei vorhandener Normalverteilung der Werte beider Versuchsgruppen wurde der Test auf Signifikanz mittels Student's t-Test (im Text als t-Test bezeichnet) für unabhängige Stichproben durchgeführt. Lag für die Werte mindestens einer Versuchsgruppe keine Normalverteilung vor, wurde die Signifikanz mit dem Mann-Whitney-U-Test überprüft. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde dabei als statistisch signifikant angesehen.

3.7 Primärzellkultur

Für diese Versuche wurden Lebern der Wasser- und der DEN-Gruppen verwendet. Die Injektion erfolgte an Versuchstag 0. Die DEN-Dosen umfassten 2 mg DEN, 4 mg DEN oder 6 mg DEN pro Ei.

3.7.1 Verwendete Lösungen

Spülpuffer: 10 mL 0,5 M NaCl, 2,5 mL 1 M HEPES-KOH (pH=7,4), 1 mL 0,75 M NaHCO₃, 1 mL 0,25 M EGTA, 0,5 mL 0,55 mM D-Glucose, 0,5 mL 0,54 mM KCl und 0,5 µL 0,44 M KH₂PO₄ wurden vermischt und bis 50 mL mit H₂O aufgefüllt

Verdaulösung: 10 mL 100 mM NaCl, 2,5 mL 50 mM HEPES-KOH (pH=7,4), 1 mL 15 mM NaHCO₃, 0,5 mL 5,5 mM D-Glucose, 0,5 mL 5,4 mM KCl und 100 U/mL Collagenase Typ II wurden vermischt und bis 50 mL mit H₂O aufgefüllt

Färbelösung: 0,1 mL Trypanblau und 0,9 mL Verdaulösung wurden gemischt

Waschmedium: 50 mL DMEM und 0,5 µl Gentamicin wurden gemischt

Vollmedium: 425 mL DMEM, 75 mL FKS, 5 mL Glutamin, 5 mL Penicilin/Streptomycin, 1,325 mL Insulin und 94 µL Dexamethason wurden gemischt

3.7.2 Ablauf

Nach Dekapitation des Embryos wurde der Torso eröffnet. Herz, Magen und Darm wurden entfernt. Der Spülpuffer wurde in Hilusnähe erst in den einen, dann in den anderen Leberlappen injiziert. Die Kanüle wurde dabei ca. 0,5 mm eingeführt. Das erfolgreiche Ausspülen des Blutes aus dem Gewebe war an der hellen Verfärbung der Leber erkennbar. Ebenso wurde mit der angefärbten Verdaulösung (= Färbelösung) verfahren. Durch die blaue Färbung der Leber auf Grund des enthaltenen Trypanblau war erkennbar, wie vollständig und gleichmäßig die Perfusion war. Das injizierte Volumen betrug jeweils etwa 2 bis 4 mL. Anschließend wurde die Leber in eine Petrischale überführt und mit zwei spitzen Pinzetten so klein wie möglich zerrissen. Unter einer Sterilbank wurden 10 mL Verdaulösung zugegeben. Dieses Gemisch wurde

in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und 40 min im Wasserbad bei 37 °C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nach 5 min Zentrifugieren bei 250 rcf wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 mL DMEM + Gentamicin resuspendiert und die Suspension 5 min bei 250 rcf zentrifugiert. Dies wurde zweimal wiederholt und der Überstand nach dem letzten Zentrifugieren abgenommen. Das Pellet wurde in 11 mL Vollmedium resuspendiert. In eine 75 cm²-Zellkulturflasche wurden 15 mL Vollmedium gegeben. Es wurden 5 mL Zellsuspension zugegeben. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C.

Am nächsten Tag wurden das Medium abgesaugt, die Zellen mit 4 mL Waschmedium gewaschen und 20 mL Vollmedium zugegeben.

Je nach Dichte der Zellen wurden diese nach drei bis vier Tagen gesplittet. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 mL 1x PBS gespült und mit 3 mL 1x Trypsin für maximal 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Trypsinreaktion mit 8 mL Vollmedium wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 240 rcf 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde je nach Splittverhältnis in Vollmedium resuspendiert und in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit entsprechendem Volumen Vollmedium ausplattiert. Wenn die Zellen so ausgewachsen waren, dass sie zusammenhängend einen großen Bereich abdeckten, wurden sie am inversen Mikroskop fotografiert.

Zusätzlich wurde am Präparationstag die jeweilige Zellsuspension auf einem Objektträger ausplattiert. Dieser wurde in eine Vertiefung der 4-er Multischale für Objektträger gelegt. Auf diesen wurde 1 mL Zellsuspension pipettiert, anschließend 5 mL Vollmedium zugegeben. Die Inkubation erfolgte ebenfalls im Brutschrank bei 37 °C. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden nicht gesplittet, sondern gefärbt, sobald sie als zusammenhängender großer Bereich ausgewachsen waren.

3.7.3 Färbung der Objektträger

Die Objektträger mit den Zellen der Primärzellkultur wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Hierzu wurden die Objektträger zuerst in PBS (Herstellung siehe Kapitel 3.4.4.1) gespült. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen für 15 min in 10%iger neutral gepufferter Formalinlösung. Nach Spülen in einer Lösung aus PBS unter Zusatz

von 0,5 % Triton[®] X-100 wurden die Zellen nach dem Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt, entwässert und eingedeckt (Kapitel 3.4.4.3).

3.8 Bestimmung des Platingehalts im Gewebe

3.8.1 Messmethode

Die flammenlose Atomabsorptionsspektrometrie ermöglicht die Bestimmung des Platingehalts in biologischen Proben. Diese Methode diente als Nachweis, ob das auf die Chorio-Allantois-Membran (CAM) applizierte Cisplatin in die Leber der Putenembryonen gelangt war. Es handelt sich dabei um ein spektralanalytisches Verfahren. Die zu untersuchende Probe wurde in ein Graphitrohr eingespritzt. An dieses sind zwei Elektroden gekoppelt. Unter Anwendung eines auf Platin abgestimmten Temperaturprogrammes, wurden die im Untersuchungsmaterial enthaltenen Metallatome in den gasförmigen Zustand überführt. Hierbei wird die Probe getrocknet, verascht, verascht und atomisiert. Diese Platinatome absorbieren dann Licht einer bestimmten Wellenlänge. Durch Messung der Lichtabsorption kann der Platingehalt in der Probe bestimmt werden.

3.8.2 Ablauf

Die Puteneier wurden am Versuchstag 0 ohne Behandlung in den Brutschrank eingelegt. Am d9 erfolgte die CAM-Verlagerung. Die Applikation von Cisplatin erfolgte am Versuchstag 20 (1 mg pro Ei) oder am Versuchstag 23 (1 mg, 2 mg bzw. 4 mg Cisplatin pro Ei). Der Versuch wurde am Versuchstag 24 beendet. Die Lebern vitaler Embryonen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Als Vorbereitung für die Platinmessung mittels flammenloser Atomabsorptionsspektrometrie wurden die Lebern aufgetaut und gewogen. Den Lebern wurde Wasser zugefügt. Das Volumen war äquivalent zum Wert des Lebergewichtes. Wog die Leber beispielsweise 530 mg, wurden 530 µL Wasser zugegeben. Anschließend wurden die Lebern unter Verwendung des TissueRuptor[®] 1,5 min homogenisiert.

Die folgenden Schritte wurden im Bereich Klinische Pharmazie der Universität Bonn von Dr. Carina Mohn aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Jaehde durchgeführt.

Entsprechend der Masse des Leberhomogenates wurde den Proben die 1,5fache Menge an 65%iger Salpetersäure zugegeben. Bei einer Homogenatmasse von z. B. 0,83 mg wurden entsprechend 1,245 ml 65%iger Salpetersäure zugefügt. Dieses Gemisch wurde bei 80 °C lysiert, bis eine klare Lösung erkennbar war (ca. 24 h). Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden Proben mit PureLab Plus[®]-Wasser um den Faktor 10 verdünnt. Vor der Messung der Proben erfolgte eine Kalibrierung unter Verwendung von Standardlösungen mit einer Platinkonzentration von 50, 100, 200, 300, 400 und 500 µg/L. Anschließend wurden die Untersuchungsproben und in definierten Abständen Qualitätskontrollproben (100, 200 und 450µg/L) vermessen.

3.8.3 Berechnung

Unter Verwendung der gemessenen Werte der Standardlösungen wurde eine Kalibrierkurve erstellt, mit der die Platinkonzentration im Untersuchungsmaterial [µg/L] berechnet werden konnte. Ausgehend davon wurde unter Einbezug des zugefügten Wassers während der Homogenisierung und der zugesetzten Salpetersäure der Platingehalt in der jeweiligen Probe errechnet [µg Platin/g Leber]. Durch Einbezug der molaren Massen wurde der entsprechende Cisplatingehalt in der Leber ermittelt [µg Cisplatin/g Leber].

4 Ergebnisse

4.1 Methodenentwicklung

4.1.1 Induktion fokaler hepatozellulärer Veränderungen

In der embryonalen Putenleber können unter Verwendung von Diethylnitrosamin (DEN) fokale hepatozelluläre Veränderungen induziert werden. Diese werden als „foci of altered hepatocytes“ (FAH) bezeichnet. Ein Teilziel der vorliegenden Arbeit war die Auswahl einer geeigneten DEN-Dosis zur Induktion der FAH. Dabei sollten die Embryonen und Lebern nicht zu sehr geschädigt werden, um eine zweite Behandlung mit Tumorthapeutika zu ermöglichen.

4.1.1.1 Verwendung von Diethylnitrosamin

Zur Festlegung der am besten geeigneten Methode zur Induktion von FAH wurden verschiedene DEN-Dosen getestet. Als Kriterien der Dosiswahl wurden der Einfluss auf die Überlebensrate (von Versuchstag 0 bis 24) untersucht und die Lebern histologisch beurteilt. Es wurde die Auswirkung der ein- und zweimaligen Injektion von 2 mg DEN, und der jeweils einmaligen Injektion von 6 mg und 8 mg DEN überprüft.

Mit steigender DEN-Dosis überlebten weniger Embryonen. Die Injektion von 2 mg DEN hatte im Vergleich zur Injektion von Wasser keine (Versuch DEN 1 und DEN 3) oder nur geringe negative Auswirkungen (Versuch DEN 2 und DEN 4) auf die Überlebensrate. Im Versuch DEN 3 überlebten beispielsweise 85 % der Embryonen der 2 mg DEN-Gruppe, 55 % der Embryonen der 6 mg DEN-Gruppe und 28 % der 8 mg DEN-Gruppe, während nach Injektion mit Wasser 85 % der Embryonen überlebten. Eine zweimalige Injektion von 2 mg DEN verringerte die Überlebensrate gegenüber einer einmaligen Injektion. Der Injektionszeitpunkt (DEN 2: Versuchstag 14; DEN 3 und DEN 4: Versuchstag 7) spielte keine Rolle.

Auf Grund der Applikationsform war für die Untersuchung des Einflusses der verwendeten Platinverbindungen auf hepatozelluläre Veränderungen eine CAM-Verlagerung der Eier nötig. Im Vergleich zu Eiern ohne CAM-Verlagerung (Versuch DEN 3) waren die Überlebensraten in der Gruppe mit CAM-Verlagerung (Versuch DEN 4) etwa 40 % niedriger, während das Verhältnis der Zahlen gleich blieb (Tab. 1).

Tab. 1: Einfluss von DEN auf das Überleben von Putenembryonen in verschiedenen Versuchen.

d0 DEN [mg/Ei]	d7 bzw. d14 Injektion 2	Versuch ^a DEN 1		Versuch ^a DEN 2		Versuch ^a DEN 3		Versuch ^b DEN 4	
		n ^c	ÜR	n ^d	ÜR	n ^e	ÜR	n ^e	ÜR
- (Wasser)	-	49	45 %	10	76 %	8	85 %	9	47 %
2	-	57	51 %	7	62 %	13	85 %	12	54 %
2	2 mg DEN/Ei			12	47 %	15	61 %	15	37 %
6	-					13	55 %	14	32 %
8	-	57	21 %			21	28 %	21	16 %

d = Versuchstag, Versuch^a = Eier wurden liegend inkubiert, Versuch^b = Eier wurden ab d10 stehend inkubiert, DEN = Diethylnitrosamin, n^c = Anzahl Eier an d0, n^d = Anzahl Eier und Injektion 2 an d14, n^e = Anzahl Eier und Injektion 2 an d7, ÜR = Überlebensrate von d0 bis d24.

Auch die Embryo- und Lebergewichte verringerten sich mit steigender DEN-Dosis (siehe Tabelle 74 und 75 im Anhang). Im Vergleich zum Embryogewicht nach Wasserinjektion waren die Embryogewichte der 2 mg + 2 mg DEN-, der 6 mg DEN- und der 8 mg DEN-Gruppe signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test, genaue Werte siehe Tabelle 74). Nach Behandlung mit 2 mg DEN wies das Embryogewicht keinen Unterschied im Vergleich zur Behandlung mit Wasser auf. Das zeigte sich auch für das Lebergewicht. In den anderen DEN-Dosisgruppen dagegen war das Lebergewicht geringer als nach Behandlung mit Wasser. Hierfür waren die Unterschiede zum Teil signifikant (Mann-Whitney-U-Test, genaue Werte siehe Tabelle 75). Das relative Lebergewicht wies nur nach Behandlung mit 8 mg DEN im Vergleich zur Behandlung mit Wasser einen signifikanten Unterschied auf.

Für die Dosisfindungsstudien wurde je Leber ein Schnitt auf FAH hin untersucht. In der 2 mg DEN-Gruppe war durchschnittlich 1 FAH pro Leberschnitt zu finden. Das extrafokale Gewebe zeigte eine ähnliche Struktur wie das der Lebern der Kontrolle (Behandlung mit Wasser). Ein Unterschied in der Morphologie der Zellen war das Vorhandensein einiger Hepatozyten mit stark vergrößertem Zellkern (Megalozyten) nach Behandlung mit DEN. Auf diese Zellen wird in einem späteren Abschnitt eingegangen.

In der 2 mg DEN + 2 mg DEN-Gruppe gab es viele Megalozyten im extrafokalen Gewebe und es waren im Mittel 0,8 FAH pro Leberschnitt zu finden.

In der 6 mg DEN-Gruppe erschien die Leberstruktur ungeordnet, es gab viele Megalozyten und es kamen durchschnittlich 1,1 FAH pro Leberschnitt vor.

Das Lebergewebe aus Embryonen der 8 mg DEN-Gruppe wies im extrafokalen Gewebe hauptsächlich Megalozyten auf. Nur die Größe einiger Zellkerne war mit der von Hepatozyten vergleichbar, die den Hauptanteil in Lebern aus der 2 mg DEN-Gruppe ausmachten. Die ursprüngliche Leberstruktur war stark verändert und die Abgrenzung einzelner FAH war meist nicht möglich. Die Lebern der 8 mg DEN-Gruppe waren häufig nekrotisch. Es waren durchschnittlich 1,4 FAH pro Leberschnitt zu finden.

Auf Grund der geringen Überlebensrate, vor allem bei zusätzlicher CAM-Verlagerung und dem stark veränderten Lebergewebe, wurde eine Dosierung von 8 mg DEN pro Ei als zu hoch eingestuft. Eine zweimalige Injektion von 2 mg DEN senkte die Überlebensrate gegenüber einer einmaligen Injektion von 2 mg DEN ohne zu mehr FAH zu führen. Es wurde deshalb von diesen Methoden der FAH-Induktion abgesehen.

4.1.1.2 Verstärkung der Wirkung von DEN durch Behandlung mit Promotoren

Es wurde untersucht, ob die zusätzliche Injektion von bekannten Promotoren die Induktion der FAH in der embryonalen Putenleber verstärkt. Dabei wurden Phenobarbital und 3-Methylcholanthren getestet.

Phenobarbital

Bei Injektion mit Wasser hatte die anschließende Behandlung mit Phenobarbital (PB) keinen Einfluss auf das Überleben der Embryonen (Tab. 2). In mit DEN-behandelten Eiern blieb die Gabe von 12 mg Phenobarbital ohne relevanten Einfluss auf die Überlebensrate der Embryonen. Die doppelte Phenobarbitaldosis führte zu einem 40%igen Anstieg der Überlebensrate innerhalb der 2 mg DEN-Gruppe. Auf das Überleben der Embryonen der 8 mg DEN-Gruppe hatte die hohe Dosis Phenobarbital keinen eindeutigen Effekt. Im Vergleich zu PBS war die Überlebensrate im Versuch PB 1 fast vier Mal höher, im Versuch PB 2 um die Hälfte geringer.

Tab. 2: Einfluss von Phenobarbital auf das Überleben von Putenembryonen in zwei Versuchen.

PB [mg/Ei]	Versuch PB 1						Versuch PB 2	
	Wasser		2 mg DEN		8 mg DEN		8 mg DEN	
	n	ÜR	n	ÜR	n	ÜR	n	ÜR
- (PBS)	10	80 %	8	48 %	9	10 %	10	25 %
12	13	80 %	12	57 %	14	18 %	13	20 %
24	17	71 %	18	68 %	19	36 %	14	14 %

PB = Phenobarbital, DEN = Diethylnitrosamin, PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, Versuch PB 1 = Injektion von Wasser bzw. DEN an Versuchstag 0 und Injektion von PBS bzw. PB an Versuchstag 21, Versuch PB 2 = Injektion von Wasser bzw. DEN an Versuchstag 0 und Injektion von PBS bzw. PB an Versuchstag 14, n = Anzahl Eier bei Injektion am Versuchstag 21, ÜR = Überlebensrate.

Pro Leber wurde repräsentativ ein Schnitt auf das Vorhandensein von FAH untersucht. Die Anzahl FAH in einer Versuchsgruppe wurde auf die Zahl untersuchter Lebern gemittelt (Tab. 3). Nach Behandlung mit Wasser und Phenobarbital wurden, wie erwartet, keine FAH induziert. Weder in Lebern der 2 mg DEN-Gruppe noch denen der 8 mg DEN-Gruppe erhöhte sich die Zahl der FAH durch die zusätzliche Gabe von Phenobarbital im Vergleich zu PBS. Die Behandlung mit Phenobarbital förderte die Zahl der durch DEN-induzierten FAH nicht. Es wurden keine weiteren Versuche mit Phenobarbital durchgeführt.

Tab. 3: Einfluss von Phenobarbital auf die Anzahl der FAH-Anschnitte in zwei Versuchen.

PB [mg/Ei]	Versuch PB 1						Versuch PB 2	
	Wasser		2 mg DEN		8 mg DEN		8 mg DEN	
	n _{Leber}	n _{FAH}						
- (PBS)	4	0	5	0	1	0	4	1,00
12	12	0	9	0,11	3	0,67	4	1,00
24	15	0	16	0,06	8	1,00	3	0

PB = Phenobarbital, DEN = Diethylnitrosamin, PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, Versuch PB 1 = Injektion von Wasser bzw. DEN an Versuchstag 0 und Injektion von PBS bzw. PB an Versuchstag 21, Versuch PB 2 = Injektion von Wasser bzw. DEN an Versuchstag 0 und Injektion von PBS bzw. PB an Versuchstag 14, n = Anzahl, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderungen.

3-Methylcholanthren

Die zusätzliche Gabe von 3-Methylcholanthren hatte unterschiedliche Effekte auf das Überleben der Embryonen Bei Injektion mit Wasser. Im Vergleich zur Kontrolllösung (DMSO) führte die niedrige Dosis zu einer höheren Überlebensrate, die höhere Dosis zeigte keinen Unterschied. Auf die Überlebensrate der Embryonen der 2 mg DEN- und 8 mg DEN-Gruppe hatte keine der beiden getesteten Dosen einen Einfluss (Tab. 4).

Tab. 4: Einfluss von 3-Methylcholanthren auf das Überleben von Putenembryonen in einem Versuch.

Injektion an Versuchstag 21	Injektion an Versuchstag 0					
	Wasser		2 mg DEN		8 mg DEN	
3-MC [mg/Ei]	n	ÜR	n	ÜR	n	ÜR
- (DMSO)	11	45 %	8	62 %	9	16 %
2	10	62 %	12	62 %	10	9 %
5	10	43 %	11	51 %	9	10 %

3-MC = 3-Methylcholanthren, DEN = Diethylnitrosamin, n = Anzahl Eier bei Injektion am Versuchstag 21, ÜR = Überlebensrate von Versuchstag 0 bis 24, DMSO = Dimethylsulfoxid.

Pro Leber wurde repräsentativ ein Schnitt auf das Vorhandensein von FAH untersucht. Die Anzahl FAH in einer Versuchsgruppe wurde auf die Zahl untersuchter Lebern gemittelt. Nach Behandlung mit Wasser und 3-Methylcholanthren fanden sich keine FAH. Nach Induktion von FAH mit 2 mg bzw. 8 mg DEN hatte 3-Methylcholanthren keinen fördernden Einfluss auf die Zahl der FAH-Anschnitte (Tab. 5). Es wurde deshalb von der Verwendung von 3-Methylcholanthren abgesehen.

Tab. 5: Einfluss von 3-Methylcholanthren auf die Anzahl der FAH-Anschnitte in einem Versuch.

Injektion an Versuchstag 21	Injektion an Versuchstag 0					
	Wasser		2 mg DEN		8 mg DEN	
3-MC [mg/Ei]	n _{Leber}	n _{FAH}	n _{Leber}	n _{FAH}	n _{Leber}	n _{FAH}
- (DMSO)	3	0	8	0,38	3	0,67
2	4	0	12	0	2	1,50
5	5	0	8	0	2	0

3-MC = 3-Methylcholanthren, DEN = Diethylnitrosamin n = Anzahl, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderungen, DMSO = Dimethylsulfoxid.

4.1.2 Dosisfindung Sorafenib

Die Überlebensrate stellte das Hauptkriterium für die Dosiswahl für Sorafenib dar. Zuerst wurden Dosisfindungsstudien an unbehandelten Eiern durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden für die Dosiswahl bei DEN-behandelten Eiern verwendet.

4.1.2.1 Dosisfindung Sorafenib an unbehandelten Eiern

Wie in Kapitel 3.4.3.1 beschrieben, wurde eine Anfangsdosis von 1,1 mg Sorafenib pro Ei berechnet. Im ersten Versuch wurden für die Dosisfindung von Sorafenib an unbehandelten Eiern ebenfalls noch zwei niedrigere Dosen getestet, die sich je um den Faktor 5 unterschieden (0,22 und 0,044 mg pro Ei). Das als Feststoff vorliegende Sorafenib (p-Toluensulfonat) wurde in DMSO gelöst und an Versuchstag 8 injiziert. Bei allen drei Dosen war kein Effekt auf die Überlebensrate der Embryonen sichtbar. Die Überlebensrate betrug im Mittel 75 % und war annähernd so groß wie die der DMSO-Gruppe, die als Kontrollgruppe diente (Tab. 6, Sorafenib 1). Daraufhin wurde der nächste Versuch mit einer deutlich höheren Maximaldosis (2,2 bis 24 mg Sorafenib pro Ei) angesetzt, um die von einem Putenembryo tolerierte Menge Sorafenib zu ermitteln. In diesem Experiment gab es beim Versuchsende nur einige lebende Embryonen in der Gruppe der höchsten Sorafenibdosis. Daraufhin wurden für die niedrigeren Dosen im nachfolgenden Versuch (Sorafenib 3) noch einmal die Überlebensraten ermittelt. Auch dieses Mal gab es ab einer Dosis von 2,2 mg keine Überlebenden. Gleichzeitig wurden noch einmal niedrigere Dosen von 1,1 und 0,22 mg Sorafenib pro Ei untersucht. In diesem Dosisbereich gab es überlebende Embryonen. Dieser Versuch bestätigte das Überleben der Embryonen bei einer Sorafenibdosis kleiner 1,1 mg pro Ei und zeigte erneut, dass eine Dosis größer 2,2 mg pro Ei keine lebenden Embryonen hervorbringt. Zudem wurde deutlich, dass Sorafenib in Puteneiern eine steile Dosiswirkungskurve hatte. Diese wurde im nächsten Versuch weiter eingeengt. So wurden die Überlebensraten bei einer schrittweisen Erhöhung der Dosis von 1,1 bis 2,1 mg pro Ei überprüft. Dabei zeigte sich eine Dosisabhängigkeit des Überlebens. Mit steigender Sorafenibdosis waren weniger Embryonen am Versuchsende vital.

Die stichprobenhafte mikroskopische Untersuchung der Lebern zeigte keine Auffälligkeiten von Lebern der Sorafenibgruppe gegenüber denen aus der DMSO-Gruppe.

Tab. 6: Einfluss von Sorafenib auf das Überleben von Putenembryonen in verschiedenen Versuchen.

d8 Sorafenib [mg/Ei]	Sorafenib ^a 1		Sorafenib ^b 2		Sorafenib ^b 3		Sorafenib ^b 4	
	n	ÜR	n	ÜR	n	ÜR	n	ÜR
- (DMSO)	15	73 %	8	75 %	7	100 %	15	73 %
0,044	14	79 %						
0,22	15	60 %			18	72 %		
1,1	15	87 %			18	56 %	25	72 %
1,4							25	68 %
1,8							25	40 %
2,1							25	12 %
2,2			15	0 %	18	0 %		
7,3			15	0 %	18	0 %		
24			15	13 %				

d = Versuchstag, n = Anzahl Eier an d8, ÜR = Überlebensrate von d8 bis d24, Sorafenib^a = 50 µL Injektionsvolumen, Sorafenib^b = 100 µL Injektionsvolumen, DMSO = Dimethylsulfoxid.

Die durchgeführten Versuche zur Dosisfindung von Sorafenib in unbehandelten Puteneiern zeigten anhand der untersuchten Embryoüberlebensrate eine steile Dosis-Wirkungskurve. Die Dosis von 1,1 und 1,4 mg Sorafenib führten zu einem Überleben etwa gleich der Kontrolle und bei höherer Dosis stieg die Mortalität steil an. Ab einer Dosis von 2 mg Sorafenib überlebten kaum noch Embryonen.

4.1.2.2 Dosisfindung Sorafenib an DEN-Eiern

Zum Zeitpunkt der Dosisfindung für Sorafenib (SF) an DEN-Eiern lag noch kein abschließendes Ergebnis über die Höhe der DEN-Dosis zur FAH-Induktion vor.

Nach vorangegangenen Untersuchungen des Einflusses von Sorafenib auf das Überleben von Embryonen aus Kontrolleiern (siehe Kapitel 4.1.2.2) wurde auf Grund der Überlebensraten eine Sorafenibdosis von 1,4 und 1,8 mg pro Ei an 6 mg DEN-Eiern getestet. Bei der hohen Dosis gab es beim Versuchsende keine überlebenden Embryonen und bei der niedrigeren lag die Überlebensrate bei 5 % (DEN+SF 1, Tab. 7). Daraufhin wurden im zweiten Versuch 1,0 und 0,5 mg Sorafenib pro Ei eingesetzt. Die Überlebensraten betrugen 20 % und 40 %. Im nächsten Experiment wurden erneut

0,5 mg pro Ei getestet und es ergab sich eine vergleichsweise geringere Überlebensrate von 18 %.

Die Überlebensraten bei Injektion von 6 mg DEN und DMSO waren im zweiten und dritten DEN+SF-Versuch mit 14 % und 9 % deutlich geringer als bei „DEN+SF 1“ (50 %). Verglichen dazu führte die alleinige Injektion von 6 mg DEN zu einer durchschnittliche Überlebensrate von 40 % (siehe Kapitel 4.1.1.1). Das Embryoüberleben dieser DEN-Dosisgruppe wurde scheinbar durch eine nachfolgende Injektion sehr beeinträchtigt. Dies wird auch durch einen Vergleich mit der Überlebensrate der 2 mg DEN- und DMSO-Gruppe innerhalb des dritten Versuches deutlich, die mit 65 % weitaus höher war.

Im Versuch „DEN+SF 3“ wurde auch die Sorafenibverträglichkeit für 2 mg DEN-Eier geprüft. Da diese im Durchschnitt eine höhere Überlebensrate als 6 mg DEN-Eier hatten (67 % zu 55 %, siehe Kapitel 4.1.1.1) wurde gefolgert, dass eine höhere Verträglichkeit von Sorafenib vorliegt. Nach einer Behandlung mit 1 mg Sorafenib pro Ei lag die Überlebensrate bei 40 %. In einem Wiederholungsversuch (DEN+SF 4) lag diese bei 50 %. Zudem wurde im Versuch DEN+SF 4 auch die niedrigere Dosis von 0,5 mg Sorafenib pro Ei getestet, wobei sich eine Überlebensrate von 89 % ergab, die der Überlebensrate in der Kontrollgruppe (2 mg DEN und DMSO) glich.

Tab. 7: Einfluss von DEN und Sorafenib auf das Überleben von Putenembryonen in verschiedenen Versuchen.

d0 DEN [mg/Ei]	d8 SF [mg/Ei]	DEN+SF 1		DEN+SF 2		DEN+SF 3		DEN+SF 4	
		n	ÜR	n	ÜR	n	ÜR	n	ÜR
2	- (DMSO)					23	65 %	26	88 %
	0,5							27	89 %
	1					25	40 %	46	50 %
6	- (DMSO)	8	50 %	14	14 %	44	9 %		
	0,5			30	40 %	45	18 %		
	1								
	1,4		20		5 %				
	1,8	30	0 %						

d = Versuchstag, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, n = Anzahl Eier an d8, ÜR = Überlebensrate von d8 bis d24.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass die durch DEN gesetzten Schäden die Toleranz gegen Sorafenib herabsetzten. Nach Vorbehandlung mit 2 mg DEN war 1 mg Sorafenib die höchste getestete Dosis, bei der sich bereits ein deutlicher Anstieg der Mortalität zeigte, jedoch genug lebende Embryonen für aussagekräftige Untersuchung zur Verfügung standen. Die niedrigere Dosis von 0,5 mg Sorafenib hatte keinen Einfluss auf die Überlebensrate der mit 2 mg DEN vorbehandelten Embryonen, führte jedoch in mit 6 mg DEN vorbehandelten Embryonen zu einem starken Anstieg der Mortalität.

Es wurde der Versuchsaufbau 2 mg DEN gefolgt von nicht mehr als 1 mg Sorafenib gewählt. Eine Übersicht der für diese Arbeit relevantesten Sorafenibdosen und den entsprechenden Stoffmengen in Bezug auf einen Menschen mit Körpergewicht von 70 kg und einem Putenei von 95 g Gewicht ist in Tabelle 8 zu finden.

Tab. 8: Übersicht der für die vorliegende Arbeit relevantesten Sorafenibdosen und den entsprechenden Stoffmengen in Bezug auf einen Menschen mit Körpergewicht von 70 kg und einem Putenei von 95 g Gewicht.

Organismus	Sorafenibdosis pro Kilogramm	entsprechende Stoffmenge Sorafenib pro Kilogramm
Mensch	800 mg/Mensch \cong 11,43 mg/kg ^a	179,40 μ mol/kg ^a
Putenei	0,5 mg/Ei \cong 5,26 mg/kg ^b	82,62 μ mol/kg ^b
	1 mg/Ei \cong 10,53 mg/kg ^b	165,24 μ mol/kg ^b
	1,1 mg/Ei \cong 11,58 mg/kg ^b	181,77 μ mol/kg ^b

kg^a = Körpergewicht, kg^b = Eigewicht.

4.1.3 Dosisfindung Cisplatin

4.1.3.1 Dosisfindung Cisplatin an unbehandelten Eiern

Wie in Kapitel 3.4.3.2 beschrieben, wurde eine Anfangsdosis von 0,33 mg Cisplatin pro Ei berechnet. In einem ersten orientierenden Versuch mit unbehandelten Eiern wurden zusätzlich noch zwei Dosen getestet, die um den Faktor 5 niedriger bzw. höher waren (0,07 und 1,65 mg pro Ei). Bei 1,65 mg Cisplatin pro Ei gab es 10 % überlebende Embryonen und für die niedrigen Konzentrationen 80 bzw. 70 %. In der Kontrollgruppe (NaCl) überlebten alle Embryonen. Für das Festlegen der maximalen Dosis wurde im nächsten Versuch 2 mg Cisplatin pro Ei appliziert. Dies ist die höchste Dosis, die mit

der verwendeten Stammlösung (1 mg/1 mL-Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung) und Volumen (2 mL) appliziert werden konnte. Am Ende des Versuches gab es keine vitalen Embryonen, d. h. diese Applikation beeinflusste die Embryonen sehr stark. Zudem wurden noch einmal die Dosen von 1,65 mg und 0,33 mg Cisplatin pro Ei und zwei Dosisstufen dazwischen getestet. Wie in Tabelle 9 unter „Cisplatin 2“ zu finden, gab es eine klare Dosisabhängigkeit. Mit steigender Cisplatindosis gab es bei Versuchsende weniger vitale Embryonen. Dabei zeigten 0,33 und 0,77 mg Cisplatin pro Ei annähernd die gleiche Überlebensrate, die etwa der der Kontrollgruppe entsprach. Die drei niedrigen Dosen wurden in einem weiteren Versuch nochmals getestet. Die Relationen der überlebenden Embryonen des vorhergehenden Versuches wurden bestätigt.

Tab. 9: Einfluss von Cisplatin auf das Überleben von Putenembryonen in verschiedenen Versuchen.

d20 Cisplatin [mg/Ei]	Cisplatin 1		Cisplatin 2		Cisplatin 3	
	n	ÜR	n	ÜR	n	ÜR
- (NaCl)	6	100 %	11	82 %	12	92 %
0,07	10	70 %				
0,33	10	80 %	11	64 %	22	73 %
0,77			11	73 %	22	77 %
1,21			11	36 %	22	59 %
1,65	10	10 %	11	18 %		
2			11	0 %		

d = Versuchstag, n = Anzahl Eier an d20, ÜR = Überlebensrate von d20 bis d24, NaCl = Natriumchlorid.

Zusammenfassend zeigten die Dosisfindungsversuche für Cisplatin an unbehandelten Eiern eine steile Dosis-Wirkungskurve, wie sie auch für Sorafenib erkennbar war (siehe Kapitel 4.1.2.1). Dosen von 1,21 mg Cisplatin pro Ei und größer zeigten eine deutlich geringere Überlebensrate als Eier, die mit der Kontrolllösung (NaCl) behandelt worden waren. Cisplatindosen von 0,77 mg pro Ei und niedriger hatten jeweils in etwa gleich große Überlebensraten. Diese waren im Vergleich zur Behandlung mit NaCl etwas geringer.

4.1.3.2 Dosisfindung Cisplatin an DEN-Eiern

Zum Zeitpunkt der Dosisfindung für Cisplatin (CP) an DEN-Eiern lag noch kein abschließendes Ergebnis über die Höhe der DEN-Dosis zur FAH-Induktion vor. Es wurden Dosisfindungsstudien für Cisplatin mit Eiern durchgeführt, denen am Versuchstag 0 2 mg, 6 mg oder 8 mg DEN injiziert worden war. Tabelle 10 stellt eine Übersicht der Überlebensraten dar.

In einem ersten Versuch (DEN+CP 1) wurde der Effekt von Cisplatin an Embryonen von 8 mg DEN-Eiern untersucht. Für diese DEN-Dosis war eine geringe Überlebensrate von durchschnittlich 20 % bekannt (siehe Kapitel 4.1.1.1). Einhergehend mit der durchschnittlichen Überlebensrate von Embryonen aus unbehandelten Eiern unter dem Einfluss von 1,21 mg Cisplatin (rund 48 %, siehe Kapitel 4.1.3.1), wurde ein noch höherer Ausfall erwartet und diese Cisplatindosis als zu hoch erachtet. Eine Cisplatindosis von 0,77 mg pro Ei wurde als zu gering eingestuft, weil hier die Überlebensrate vergleichbar mit der von Kontrollen (NaCl) war. Es wurde somit die Cisplatindosis von 1 mg pro Ei getestet. Am Versuchsende gab es keine vitalen Embryonen. Auch gab es keine vitalen Embryonen in der Kontrollgruppe. Im selben Versuch wurde auch der Effekt von 1 mg Cisplatin pro Ei bei 2 mg DEN-Eiern untersucht. Auch dabei gab es keine vitalen Embryonen. In der zugehörigen Kontrollgruppe war die Hälfte der Embryonen vital.

Parallel zu den DEN-Dosisfindungsstudien wurde die DEN-Höchstdosis in den nächsten Versuchen (DEN+CP 2 und DEN+CP 3) auf 6 mg pro Ei herabgesenkt. Auf Grund der Ergebnisse der Studien des Versuches „DEN+CP 1“ wurde an diesen Embryonen die Auswirkung von geringeren Cisplatindosen (0,4 und 0,8 mg pro Ei) analysiert. Bei 0,4 mg Cisplatin pro Ei überlebten 20 bzw. 19 % der Embryonen und bei 0,8 mg Cisplatin pro Ei 5 bzw. 6 % der Embryonen. In der Kontrollgruppe gab es keine bzw. 9 % vitale Embryonen. Anschließend wurde eine geringere Cisplatindosis getestet. In diesem Versuch (DEN+CP 4) überlebten 22 % bei 0,2 mg Cisplatin pro Ei und 7 % bei 0,4 mg Cisplatin pro Ei, während es in der Kontrollgruppe 7 % vitale Embryonen gab.

In den nächsten Versuchen wurde der Effekt von Cisplatin an 2 mg DEN-Eiern untersucht. Ausgehend von 1 mg Cisplatin pro Ei gab es zwei Gruppen mit niedrigerer Dosis (0,5 und 0,25 mg Cisplatin pro Ei). Beim Versuch „DEN+CP 5“ gab es in der Gruppe mit höchster Dosis 36 % vitale Embryonen und in den anderen beiden Gruppen

etwa 70 % vitale Embryonen, während die Kontrollgruppe 74 % Überlebende aufwies. Im Versuch DEN+CP 6 wurde dieses Muster repliziert. Bei einer Cisplatinosis von 0,5 und 0,25 mg Cisplatin pro Ei war kein klarer Effekt auf das Überleben erkennbar.

Tab. 10: Einfluss von DEN und Cisplatin auf das Überleben von Putenembryonen in verschiedenen Versuchen. Die Überlebensrate bezieht sich auf den Zeitraum von d20 bis d24.

d0 DEN [mg/Ei]	d20 CP [mg/Ei]	DEN+ CP 1	DEN+ CP 2	DEN+ CP 3	DEN+ CP 4	DEN+ CP 5	DEN+ CP 6
2	- (NaCl)	50 % (n = 6)				74 % (n = 47)	97 % (n = 35)
	0,25					73 % (n = 33)	94 % (n = 35)
	0,5					72 % (n = 36)	81 % (n = 33)
	1	0 % (n = 10)				36 % (n = 39)	50 % (n = 32)
6	- (NaCl)		0 % (n = 10)	9 % (n = 11)	7 % (n = 15)		
	0,2					22 % (n = 23)	
	0,4		20 % (n = 20)	19 % (n = 16)	7 % (n = 27)		
	0,8		5 % (n = 20)	6 % (n = 16)			
8	- (NaCl)	0 % (n = 8)					
	1	0 % (n = 16)					

d = Versuchstag, n = Anzahl Eier an d20, DEN = Diethylnitrosamin, CP = Cisplatin, bei Versuchen 1 bis 4 Applikationsvolumen an d20 2 mL, bei Versuchen 5 und 6 Applikationsvolumen an d20 1 mL, NaCl = Natriumchlorid.

Die Dosisfindungsstudien von Cisplatin an DEN-Eiern zeigten, dass Embryonen der 6 mg DEN- bzw. 8 mg DEN-Gruppe den zusätzlichen Einfluss von Cisplatin kaum bzw. nicht überlebten. Bei Embryonen der 2 mg DEN-Gruppe hatten Cisplatinosen von 0,25 und 0,5 mg keinen Effekt auf das Überleben. Sie wiesen etwa die gleiche Überlebensrate wie Embryonen der NaCl-Gruppe auf. Die Dosis von 1 mg Cisplatin pro

Ei führte zu einer durchschnittlichen Überlebensrate von 43 % und wies somit einen Effekt auf das Überleben auf. Wie auch für Sorafenib (siehe Kapitel 4.1.2.2) ist 1 mg die höchste Dosis für Cisplatin, die in 2 mg DEN-Eiern für Untersuchungen des Einflusses auf FAH als geeignet erachtet wurde.

Eine Übersicht der für diese Arbeit relevantesten Cisplatin Dosen und den entsprechenden Stoffmenge in Bezug auf einen Menschen mit einem Körpergewicht von 58 kg und einem Putenei von 95 g Gewicht ist in Tabelle 11 zu finden.

Tab. 11: Übersicht der für diese Arbeit relevantesten Cisplatin Dosen und den entsprechenden Stoffmengen in Bezug auf einen Menschen mit Körpergewicht von 58 kg und einem Putenei von 95 g Gewicht.

Organismus	Cisplatin Dosis pro Kilogramm	entsprechende Stoffmenge Cisplatin pro Kilogramm
Mensch	200 mg/Mensch \cong 3,45 mg/kg ^a	115,12 μ mol/kg ^a
Putenei	0,25 mg/Ei \cong 2,63 mg/kg ^b	87,70 μ mol/kg ^b
	0,5 mg/Ei \cong 5,26 mg/kg ^b	175,41 μ mol/kg ^b
	1 mg/Ei \cong 10,53 mg/kg ^b	350,94 μ mol/kg ^b

kg^a = Körpergewicht, kg^b = Eigewicht.

4.1.4 Proliferationsmessung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Tumorthapeutika auf die induzierten FAH und das extrafokale Lebergewebe unter Zuhilfenahme von Zellproliferationsassays untersucht. Dafür wurden mehrere Methoden in Betracht gezogen – Proliferationsmessung mit Hilfe des BrdU-Assays, des PCNA-Assays und der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

4.1.4.1 Proliferationsmessung unter Verwendung des BrdU-Assays

In einem ersten Experiment wurden fünf Eier verwendet. Als Negativkontrolle dienten Lebern aus Eiern, die nicht mit DEN behandelt wurden und keine BrdU-Lösung appliziert bekommen hatten. In daraus gewonnenen Leberschnitten waren die Zellen nach der immunhistochemischen BrdU-Detektion mit anschließender Hämatoxylin-Gegenfärbung nicht blau-schwarz gefärbt, also BrdU-negativ (Abb. 4 A). Für den Test des BrdU-Einbaus wurden an Versuchstag 24 0,5 mL BrdU-Lösung für 60 bzw. 120 min und 1 mL BrdU-Lösung für 30, 60 bzw. 120 min auf der CAM von

unbehandelten Eiern inkubiert. Bei allen getesteten Volumen-Zeit-Kombinationen konnte BrdU erfolgreich in Leberzellen embryonaler Puten eingebaut werden. Beispielsweise waren bei der Inkubation von 0,5 mL BrdU-Lösung für 120 min einige Hepatozyten blau-schwarz, also BrdU-positiv (Abb. 4 B). Die Inkubationszeit von 120 min war gut handhabbar und wurde in der Kit-Anleitung vorgeschlagen, weshalb sie im nächsten Versuch verwendet wurde. In diesem zweiten Experiment wurde der BrdU-Einbau an Puteneiern untersucht, die zur Induktion von FAH an Versuchstag 0 und Versuchstag 7 je 2 mg DEN injiziert bekommen hatten. An Versuchstag 24 wurden die Volumina von 0,25 mL und 0,5 mL BrdU-Lösung getestet. Auch hier war der BrdU-Einbau erfolgreich. Am Beispiel der Inkubation von 0,5 mL BrdU-Lösung für 120 min (Abb. 4 C) ist zu sehen, dass mehrere Hepatozyten BrdU-positiv waren. Im Vergleich zu BrdU-markierten Lebern aus Kontrolleiern waren deutlich mehr Hepatozyten gefärbt. In den hier durchgeführten Experimenten war das Ziel die Möglichkeit des BrdU-Einbaus zur Bestimmung der Proliferationsrate zu untersuchen. Deshalb spielt der Anteil gefärbter Zellen (beispielsweise pro 1000 Hepatozyten) keine Rolle und wurde nicht ermittelt. Am Beispiel einiger aufgenommener Bilder (200fache Vergrößerung) wurden die BrdU-positiven Zellen innerhalb eines aufgenommenen Bildes quantifiziert (siehe Anhang Tabelle 76).

Mit Hilfe des BrdU-Einbaus konnten proliferierende Zellen in embryonalem Lebergewebe von Puten markiert werden. Es ist möglich, diese Zellen zu zählen und unter Zuhilfenahme der Gegenfärbung die Proliferationsrate zu ermitteln. Der experimentelle Aufwand für die BrdU-Markierung ist jedoch verhältnismäßig hoch. Die Handhabung der BrdU-Markierung ist durch die Anzahl der Eier in einem Experiment, das meist 100 Eier umfasste, sehr nachteilig. Zudem wird für die immunhistochemische Detektion von BrdU viel Zeit und Material benötigt. Dies wird durch die große Anzahl an Proben (5 Schnittebenen pro Leber) noch erhöht.

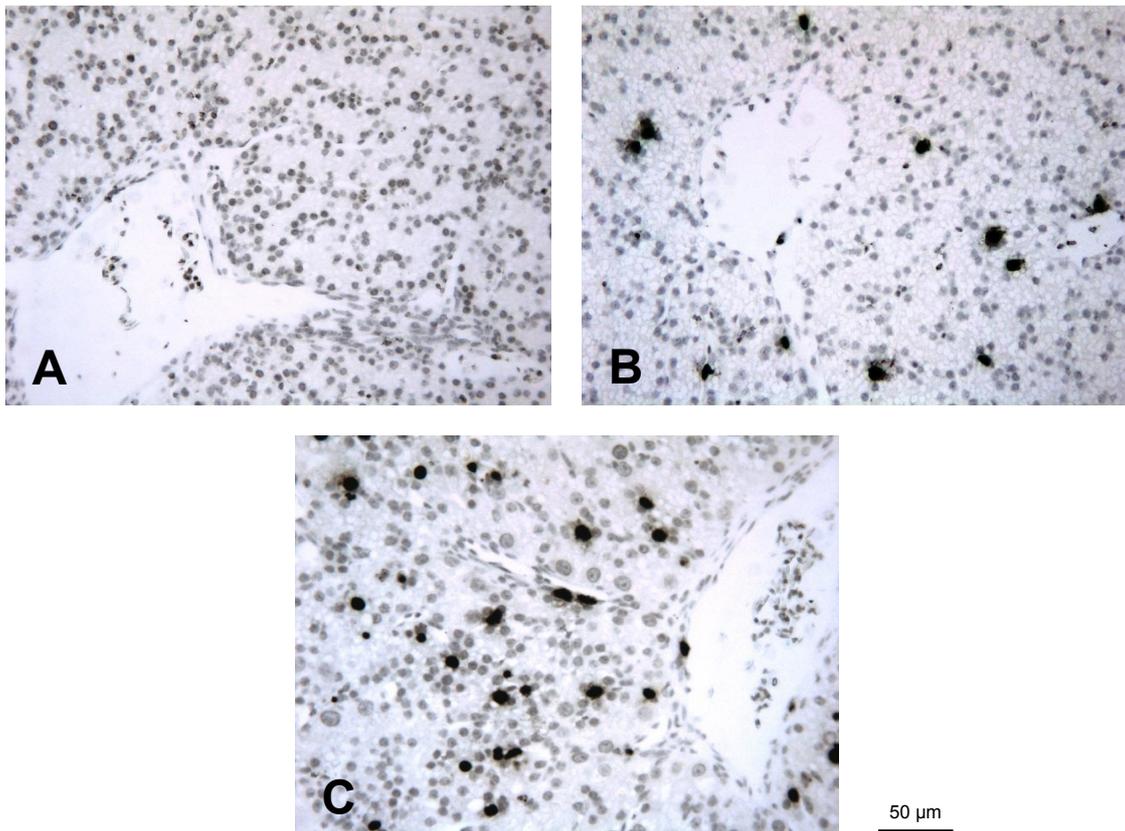


Abb. 4: BrdU-Markierung mit Hämatoxylin-Gegenfärbung.

(A) Negativkontrolle, keine BrdU-Markierung.

(B) BrdU-Markierung (blau-schwarze Zellkerne) in Lebern aus Ei, das mit Wasser injiziert worden waren.

(C) BrdU-Markierung (blau-schwarze Zellkerne) in Leber aus Ei, das mit 2 mg DEN behandelt worden war.

4.1.4.2 Proliferationsmessung unter Verwendung des PCNA-Assays

Mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises von PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) können proliferierende Zellen markiert und somit quantifiziert werden. Als Positivkontrolle diente ein im Färbungskit mitgelieferter Schnitt vom Darm einer Ratte. Dieser wies braun gefärbte PCNA-positive Zellen und mittels Gegenfärbung blau gefärbte PCNA-negative Zellen auf (Abb. 5 A).

In Paraffinschnitten embryonaler Putenleber von 2 mg DEN-Eiern waren FAH in der PCNA-Färbung gut erkennbar (Abb. 5 B). Praktisch alle Zellkerne in den FAH waren deutlich PCNA-positiv. Das Zytoplasma der Zellen der FAH war ebenfalls PCNA-positiv und schien deutlich stärker gefärbt als das Zytoplasma der den FAH umgebenden Zellen. Die Zellkerne von Erythrozyten als nicht proliferierende Zellen waren immer eindeutig PCNA-negativ, während Hepatozyten auch außerhalb von FAH oder in Kontrolllebern sehr häufig PCNA-positiv waren. Sie stellten so eine interne Kontrolle dar.

Durch den hohen Anteil an PCNA-positiven Hepatozyten in der schnell wachsenden embryonalen Putenleber bzw. den induzierten FAH erscheint die immunhistochemische Darstellung von PCNA nur eingeschränkt geeignet, um Unterschiede in der Proliferationsrate darzustellen. Insbesondere eine behandlungsbedingte Steigerung der Zellproliferation in FAH kann nicht erfasst werden, wenn von vornherein nahezu alle Zellen PCNA-positiv sind. Zudem ist der experimentelle Aufwand für die immunhistochemische Darstellung verhältnismäßig hoch.

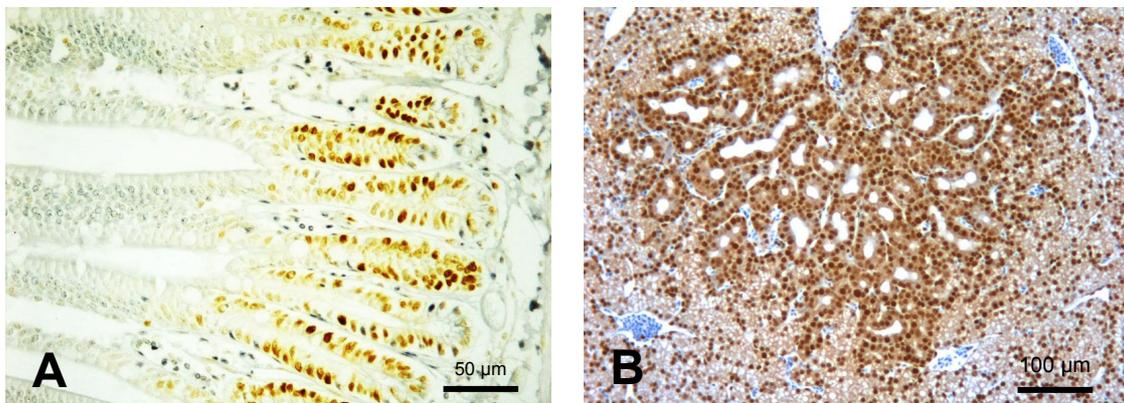


Abb. 5: PCNA-Markierung (braune Zellkerne) mit Hämatoxylin-Gegenfärbung.

(A) Positivkontrolle (Rattendarm) aus PCNA-Kit, PCNA-positive Zellkernen in den Darmzotten.

(B) PCNA-Markierung in Leber aus Ei, das mit 2 mg DEN behandelt worden war. Nahezu alle Zellkerne im dargestellten FAH und im umliegenden Lebergewebe PCNA-positiv.

4.1.4.3 Proliferationsmessung unter Verwendung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach der Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung war es möglich Mitosefiguren zu identifizieren und hierdurch die Zellproliferation zu ermitteln. Als Beispiel sind Mitosefiguren in extrafokalem Lebergewebe (Abb. 6 A) und innerhalb eines FAH (Abb. 6 B) dargestellt. Die Lebern stammen aus 2 mg DEN-Eiern.

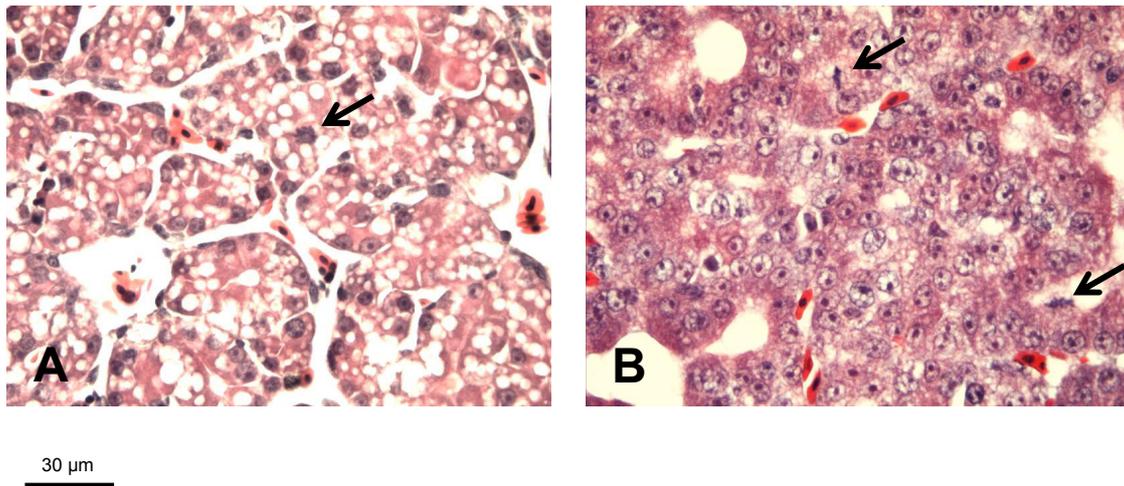


Abb. 6: Mitosefiguren (Pfeil) in HE-gefärbten Leberschnitten in DEN-Gruppe. (A) Extrafokales Lebergewebe. (B) Ausschnitt eines FAH.

4.1.4.4 Vergleich der angewandten Methoden zur Proliferationsmessung

Wegen des schnellen Wachstums im embryonalen Gewebe ist der Nachweis der Zellproliferation unter Verwendung des BrdU- und PCNA-Assays nachteilig, da neben der Mitosephase auch andere Phasen der Zellproliferation detektiert werden. In HE-gefärbten Leberschnitten lassen sich Mitosephasen eindeutig identifizieren und quantifizieren. Im Verhältnis zum BrdU- und PCNA-Assay ist die HE-Färbung ohne großen Aufwand durchführbar. Die Proliferationsmessung wurde daher in HE-gefärbten Leberschnitten durch Zählen der Mitosefiguren vollzogen.

4.1.5 Zellverlustmessung

Unter Verwendung des TUNEL-Assays waren untergehende Zellen gut zu identifizieren. FAH waren nach der Färbung meist gut sichtbar (Abb. 7 A). Die Zahl TUNEL-positiver Zellen schien in FAH höher als im extrafokalen Lebergewebe zu sein. TUNEL-positive, braun gefärbte Zellen waren von negativen, blau gefärbten Zellen abgrenzbar (Abb. 7 B). Die Ermittlung des Zellverlustes in der embryonalen Putenleber war also unter Verwendung des TUNEL-Assays möglich.

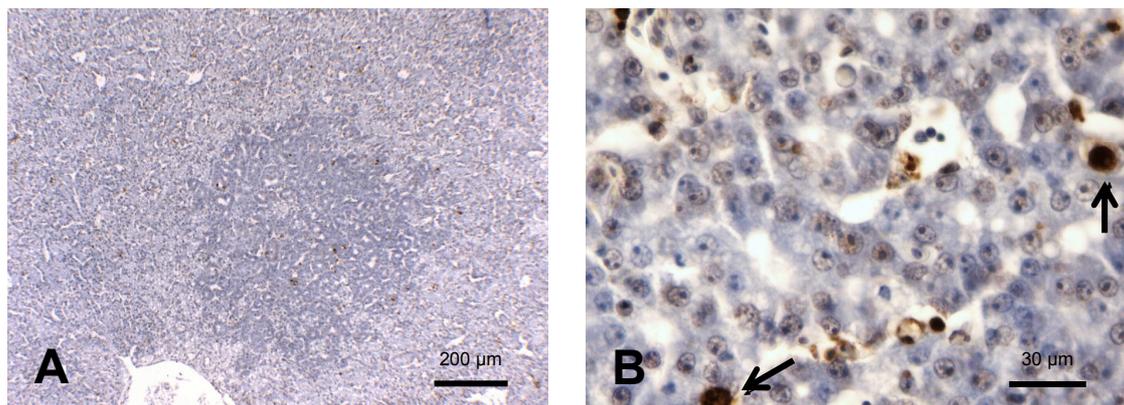


Abb. 7: TUNEL-Färbung mit Hämatoxylin-Gegenfärbung in DEN-Gruppe, TUNEL-positive Zellen braun gefärbt.

(A) FAH und extrafokales Lebergewebe.

(B) Ausschnitt eines FAH, TUNEL-positive Zellen durch Pfeile verdeutlicht.

4.1.6 Stereologie

Mit Hilfe stereologischer Analysen ist es möglich, aus den gemessenen FAH-Anschnittflächen der ausgewerteten Leberfläche Aussagen über die Anzahl FAH pro Lebervolumen (cm^3) zu treffen. Dies wurde am Beispiel des zweiten Versuches zur Untersuchung des Sorafenib-Einflusses in DEN-behandelten Eiern (DEN+Sorafenib) angewandt. Hier war das Verhältnis der Anzahl FAH-Anschnitte in der DEN+DMSO-Gruppe zu denen der DEN+(1 mg)SF-Gruppe gleich dem Verhältnis im ersten DEN+Sorafenib-Versuch. In diesem zweiten Versuch gab es die größere Anzahl an FAH, was eine gute Voraussetzung der stereologischen Auswertung war. In Tabelle 12 ist eine Übersicht des untersuchten Gewebes gegeben.

Tab. 12: Übersicht des untersuchten Gewebes für die stereologischen Analysen. Daten ermittelt aus einem Versuch.

	DEN+DMSO	DEN+(0,5 mg)SF	DEN+(1 mg)SF
Anzahl ausgewertete Lebern	23	24	23
durchschnittliches Lebergewicht	0,74	0,75	0,78
Anzahl ausgewertete Leberschnitte	107	108	101
Fläche ausgewertete Leberschnitte [cm ²]	90,36	88,13	78,10
Anzahl gemessene FAH-Anschnitte	106	97	231

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderungen.

Aus den FAH-Anschnittflächen wurde mit den drei beschriebenen Berechnungen nach Fullman, Pugh und Enzmann (siehe Kapitel 3.5.6) die Anzahl FAH pro cm³ Lebergewebe errechnet. Hierfür benötigte Werte und Zwischenergebnisse befinden sich im Anhang (Tab. 71 bis Tab. 73 und Tab. 77). Die Relation der FAH-Zahlen je cm³ Lebergewebe zwischen den Versuchsgruppen war bei allen Berechnungsmethoden in etwa gleich (Tab. 13). DEN+(1 mg)SF-Lebern wiesen die größte Anzahl FAH pro cm³ Lebergewebe auf. In DEN+DMSO- und DEN+(0,5 mg)SF-Lebern war sie deutlich geringer. Gleichzeitig fiel auf, dass in allen Versuchsgruppen bei der Berechnung nach Fullman die kleinste und nach Enzmann die größte Anzahl an FAH pro cm³ Lebergewebe erhalten wurde. Unter Annahme der Dichte der embryonalen Putenleber gleich 1 g/cm³, ließ sich auch die Anzahl FAH pro Leber errechnen. Das Verhältnis der Werte entsprach dem der „Anzahl FAH pro cm³“ (Tab. 13).

Tab. 13: Anzahl FAH unter Anwendung der Berechnung nach Fullman [70], Pugh [71] und Enzmann [74]. Daten ermittelt aus einem Versuch.

	Anzahl FAH pro cm ³ Lebergewebe			Anzahl FAH pro Leber		
	DEN+ DMSO	DEN+ (0,5 mg)SF	DEN+ (1 mg)SF	DEN+ DMSO	DEN+ (0,5 mg)SF	DEN+ (1 mg)SF
nach Fullman	41,6	38,3	79,1	30,1	28,7	61,7
nach Pugh	56,3	43,3	86,3	41,7	32,5	67,3
nach Enzmann	57,6	50,5	111,9	42,6	37,9	87,3

FAH = fokale hepatozelluläre Veränderungen, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Durch die Einteilung der gemessenen FAH-Anschnittflächen in Klassen war mit den Berechnungen nach Pugh und Enzmann eine Beurteilung der Größenverteilung der FAH möglich. Aus den jeweils berechneten Anzahlen FAH pro cm³ Lebergewebe in den jeweiligen FAH-Klassen (siehe Anhang Tabelle 72 und 77) ließen sich die prozentualen Verteilungen der FAH auf die entsprechenden Klassen berechnen. Es zeigte sich bei den zwei verwendeten Methoden eine rechtssteile Größenverteilung (Abb. 8). Der Großteil der FAH befand sich in den Klassen 6 bis 8, d. h. die Mehrzahl der FAH war klein.

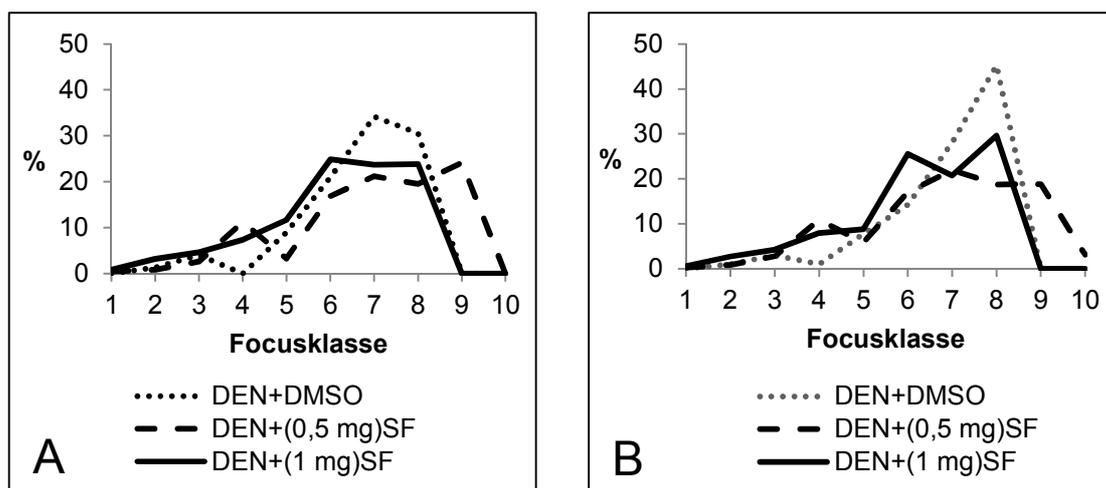


Abb. 8: Prozentuale Verteilung der Anzahl FAH pro cm³ Lebergewebe in den jeweiligen FAH-Klassen. DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib. (A) Berechnung nach Pugh et al. (B) Berechnung nach Enzmann et al.

Aus der nach Pugh und Enzmann berechneten Größenverteilung der FAH lässt sich der Gesamtvolumenanteil der FAH am ausgewerteten Gewebe errechnen. Dieser ist mit dem gemessenen Anteil der FAH-Anschnitte von der ausgewerteten Leberfläche vergleichbar. Der Wert, der aus der Berechnung nach Enzmann ermittelt wurde, kam dabei dem gemessenen Wert ziemlich nahe. Der Wert aus der Berechnung nach Pugh war etwas geringer (Tab. 14).

Tab. 14: Gemessener und nach Pugh [71] und Enzmann [74] errechneter Anteil der FAH am ausgewerteten Lebergewebe [%]. Daten ermittelt aus einem Versuch.

	DEN+DMSO	DEN+(0,5 mg)SF	DEN+(1 mg)SF
gemessen	0,12	0,15	0,60
nach Pugh	0,09	0,10	0,36
nach Enzmann	0,11	0,14	0,56

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Beim Vergleich der drei verwendeten Berechnungsmethoden zeigte die Berechnung nach Enzmann die größte Übereinstimmung mit den gemessenen Werten. Hier stimmten die errechneten Werte des Anteils der FAH am ausgewerteten Lebergewebe am besten mit den gemessenen Werten (Anteil FAH-Anschnittfläche von ausgewerteter Leberfläche) überein.

4.2 Durch DEN induzierte Veränderungen in der embryonalen Putenleber

Besonders in Lebern der DEN-Gruppen mit höherer Dosis waren Nekrosen Zeichen für vermehrte Zelluntergänge. Dies war bereits beim makroskopischen Betrachten der Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte sichtbar. In Lebern der niedrigen DEN-Dosisgruppe kamen selten Nekrosen vor. Zudem fanden sich in DEN-Lebern im Gegensatz zu Lebern der Kontrollgruppe Hepatozyten mit vergrößertem Zellkern (Megalozysten) und fokale hepatozelluläre Veränderungen (FAH).

4.2.1 Megalozyten

4.2.1.1 Histologie

Die Leber aus unbehandelten Eiern zeigte eine regelrechte Struktur. Die Läppchenstruktur war deutlich erkennbar. Hepatozyten hatten etwa gleich große Zellkerne (Abb. 9 A).

In Lebern der 2 mg DEN-Gruppe war die Leberstruktur vergleichbar mit der in Lebern aus unbehandelten Eiern. Jedoch wiesen diese Lebern auch Hepatozyten mit vergrößertem Zellkern (Megalozyten) auf. Diese kamen hauptsächlich vereinzelt vor (Abb. 9 B und C). Daneben fanden sich auch pseudoglanduläre Strukturen (Abb. 9 D).

Leberschnitte der 6 mg DEN-Gruppe hatten Bereiche mit einer definierbaren Struktur, die mit der in Lebern aus unbehandelten Eiern vergleichbar war, aber auch Bereiche ohne erkennbare regelrechte Zellanordnung. Viele Hepatozyten hatten einen Zellkern, dessen Größe mit der in Kontrollebern vergleichbar war. Daneben gab es mehrere Megalozyten (Abb. 9 E). Teilweise waren auch pseudoglanduläre Strukturen sichtbar.

In Lebern der 8 mg DEN-Gruppe war im Vergleich zu Lebern aus unbehandelten Eiern keine geordnete Struktur erkennbar. Es gab viele Bereiche, in denen Hepatozyten eine pseudoglanduläre Anordnung aufweisen. Die Lebern waren zudem stellenweise nekrotisch. Die Hepatozyten hatten unterschiedlich große Zellkerne. Zellkerne, die mit denen in Kontrollebern vergleichbar waren, kamen nur selten vor. Megalozyten machten den Großteil der Hepatozyten aus (Abb. 9 F).

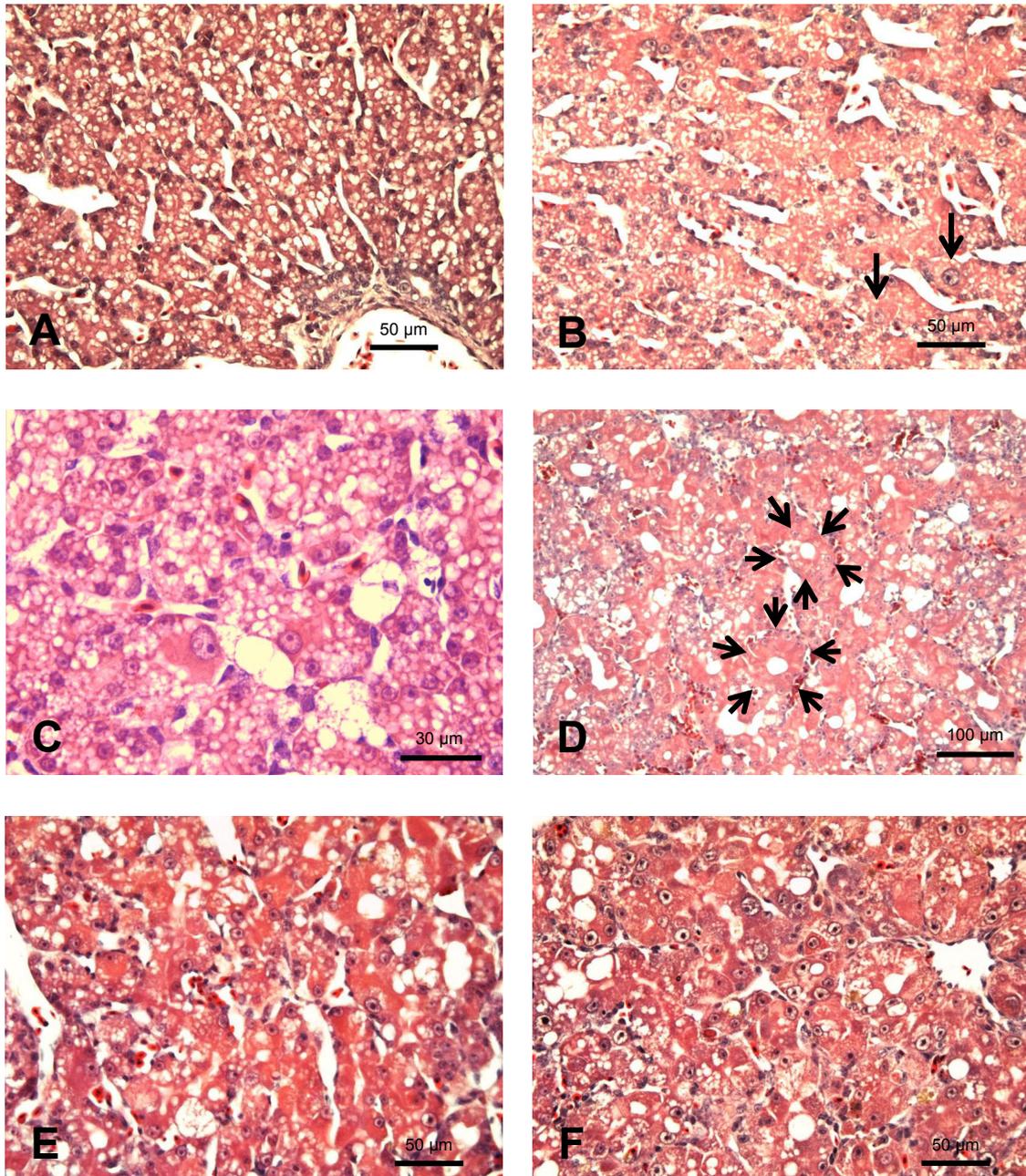


Abb. 9: Lebergewebe aus Kontroll- und DEN-Eiern. HE-Färbung.

(A) Leber aus unbehandeltem Ei, etwa gleich große Hepatozyten.

(B) 2 mg DEN-Gruppe, einige Megalozyten (Pfeil).

(C) 2 mg DEN-Gruppe, Megalozyten in Vergrößerung.

(D) 2 mg DEN-Gruppe, pseudoglanduläre Struktur (durch Pfeile verdeutlicht).

(E) 6 mg DEN-Gruppe, vermehrt Megalozyten.

(F) 8 mg DEN-Gruppe, viele Megalozyten.

4.2.1.2 Primärzellkultur

Lebern aus Eiern, die mit Wasser behandelt wurden, dienten zur Herstellung einer Primärzellkultur als Kontrolle. Die Hepatozyten wiesen annähernd gleich große Zellkerne auf (Abb. 10 A und B). Bei Primärzellkulturen von Lebern der 2 mg DEN-Gruppe waren keine Unterschiede zu den Kontrollen erkennbar. Im Gegensatz zu histologisch aufbereiteten Leberschnitten der 2 mg DEN-Gruppe (Abb. 9 C) konnten keine Hepatozyten mit größerem Zellkern – Megalozysten – gefunden werden.

Bei Primärzellkulturen der 4 mg DEN-Gruppe waren die Zellkerne unterschiedlich groß. Hauptsächlich war die Größe vergleichbar mit der von Hepatozyten der Kontrollgruppe. Daneben gab es vereinzelt auch Megalozysten (Abb. 10 C und D).

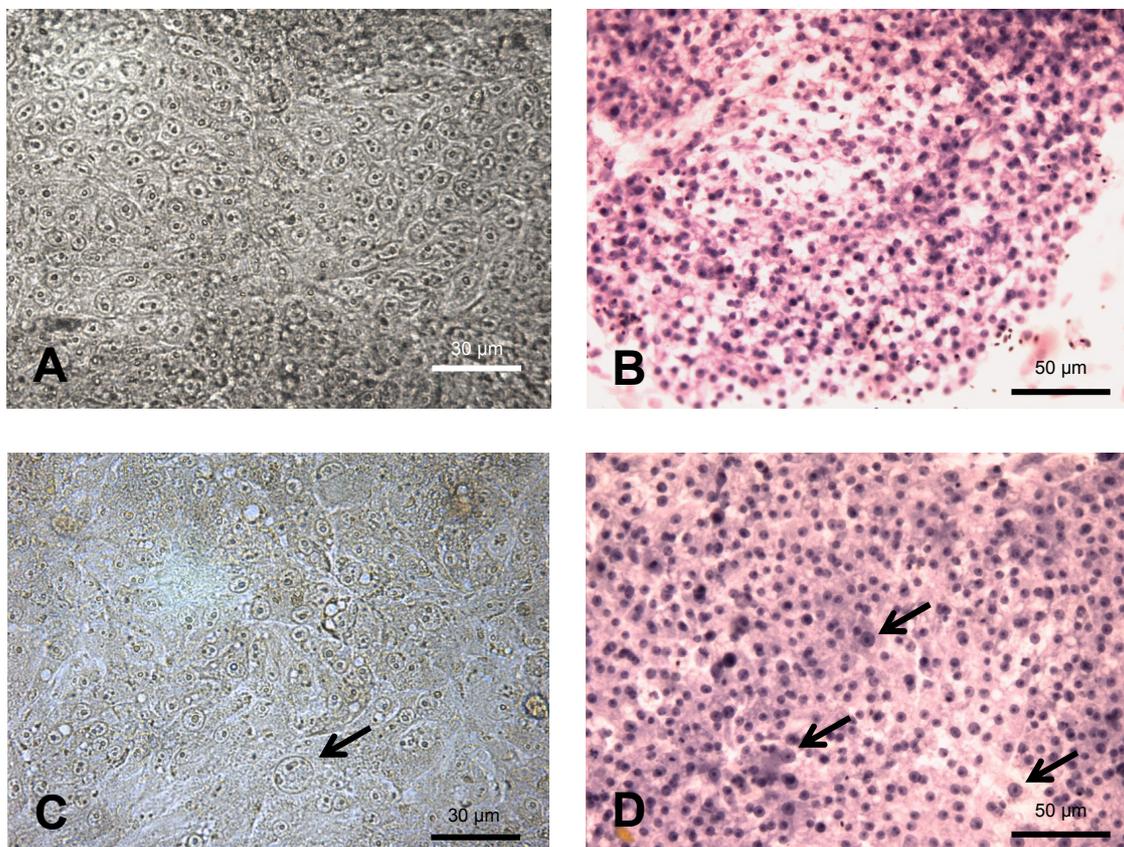


Abb. 10: Primärzellkultur aus Leber. (A + B) Kontrollgruppe, etwa gleich großen Hepatozyten.

(A) Zellen drei Tage in Zellkulturflasche gewachsen.

(B) Zellen vier Tage auf Objektträger gewachsen. HE-Färbung.

(C+D) 4 mg DEN-Gruppe mit Megalozysten (Pfeil). (C) Zellen drei Tage in Zellkulturflasche gewachsen. (D) Zellen vier Tage auf Objektträger gewachsen. HE-Färbung.

Es war möglich Megalozyten vom Gewebe in die Zellkultur zu übertragen. Im Vergleich zu histologischen Schnitten von Lebern aus der DEN-Gruppe waren Megalozyten und Mitosefiguren in Primärzellkulturen allerdings seltener zu sehen. Aus Lebern der 6 mg DEN-Gruppe ließen sich keine Hepatozyten kultivieren.

4.2.2 Fokale hepatozelluläre Veränderungen (FAH)

Fokale hepatozelluläre Veränderungen (FAH) konnten auf Grund ihres Färbeverhaltens in der HE-Färbung und ihrer histologischen Struktur identifiziert werden. Abhängig von der Färbung des Zytoplasmas konnten klarzellige, basophile und eosinophile FAH differenziert werden. Am Beispiel von Lebern, die mit 2 mg DEN behandelt wurden, soll ein Überblick repräsentativer FAH gegeben werden.

Das Zytoplasma klarzelliger FAH war in der HE-Färbung ungefärbt, wodurch diese sehr gut detektierbar waren (Abb. 11 A und B). Die Größe der Zellkerne war vergleichbar mit Zellkernen aus extrafokalem Gewebe.

Basophile FAH waren durch die Blaufärbung des Zytoplasmas in der HE-Färbung deutlich vom umliegenden Lebergewebe abgrenzbar. Es gab basophile FAH, deren Struktur der des unveränderten umliegenden Lebergewebes glich (Abb. 11 C und D). Daneben gab es auch basophile FAH, die eine tubuläre Struktur aufwiesen (Abb. 11 E und F). Die Zellkerne innerhalb jener FAH waren teilweise stark polymorph.

Eosinophile FAH zeichneten sich in der HE-Färbung durch ein Zytoplasma aus, das gegenüber dem umliegenden Lebergewebe intensiver rot war (Abb. 12 A und B). Der größte Teil eosinophiler FAH glich in der Struktur der einer Kontrollleber. Teilweise waren die Hepatozyten des eosinophilen FAH gegenüber Zellen des umliegenden Lebergewebes vergrößert. Seltener kamen auch eosinophile FAH vor, die einige tubuläre Strukturen aufwiesen (Abb. 12 C und D).

Neben dem Färbeverhalten in der HE-Färbung konnte ein FAH auch hinsichtlich seines Einflusses auf das umliegende Lebergewebe beschrieben werden. Einige, meist große, FAH zeigten eine Kompression oder Verdrängung des umliegenden Lebergewebes. Diese wurden von FAH ohne Verdrängung unterschieden und als (das umliegende Lebergewebe) komprimierender FAH bezeichnet (Abb. 12 E und F). Hier wird besonders deutlich, dass sich im FAH keine Gefäße, sondern nur tubuläre Strukturen – die Erythrozyten enthalten können – befinden.

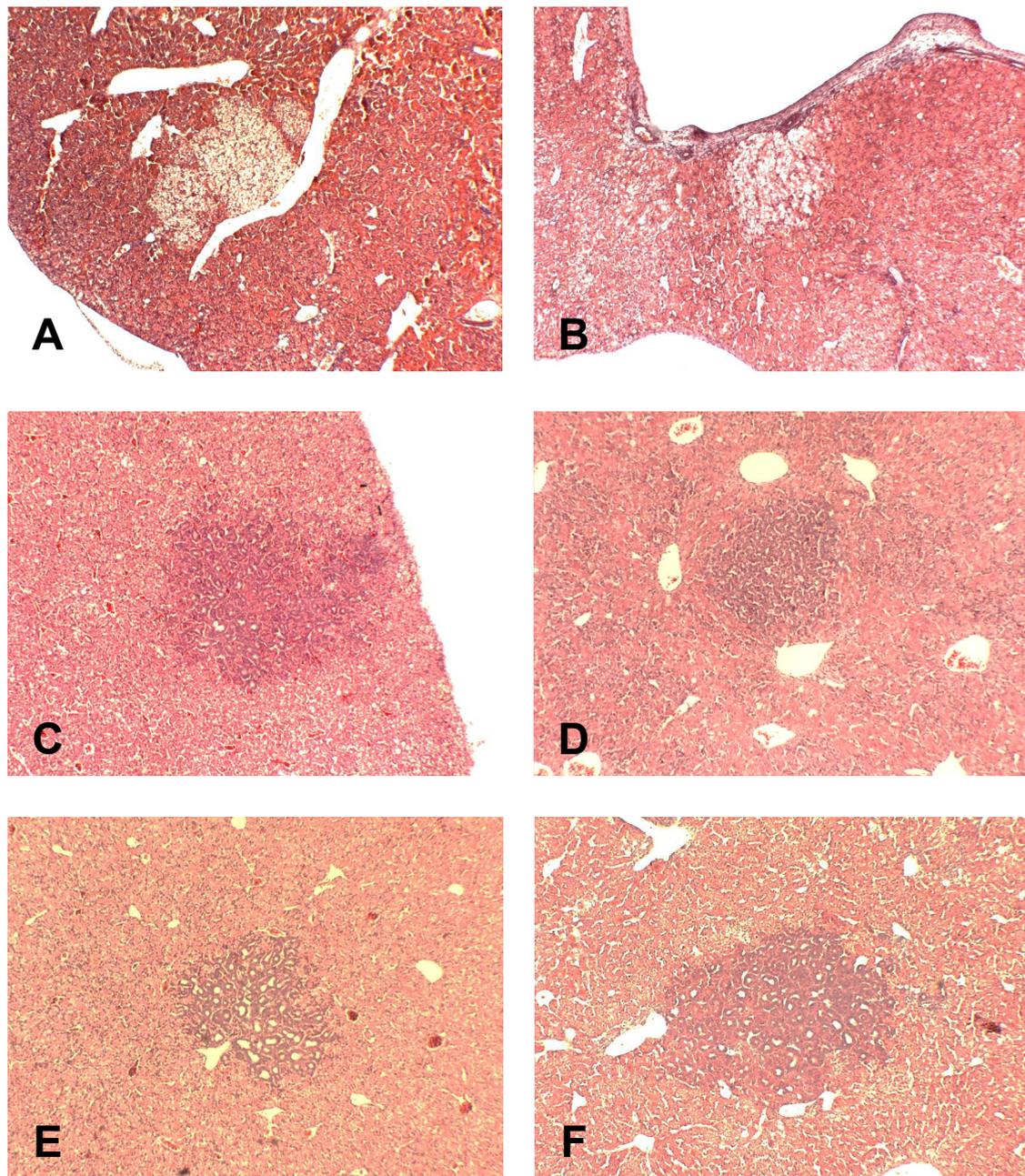


Abb. 11: FAH-Typen in embryonaler Putenleber. HE-Färbung.

(A + B) Klarzelliger FAH.

(C + D) Basophiler FAH.

(E +F) Basophiler FAH mit tubulären Strukturen.

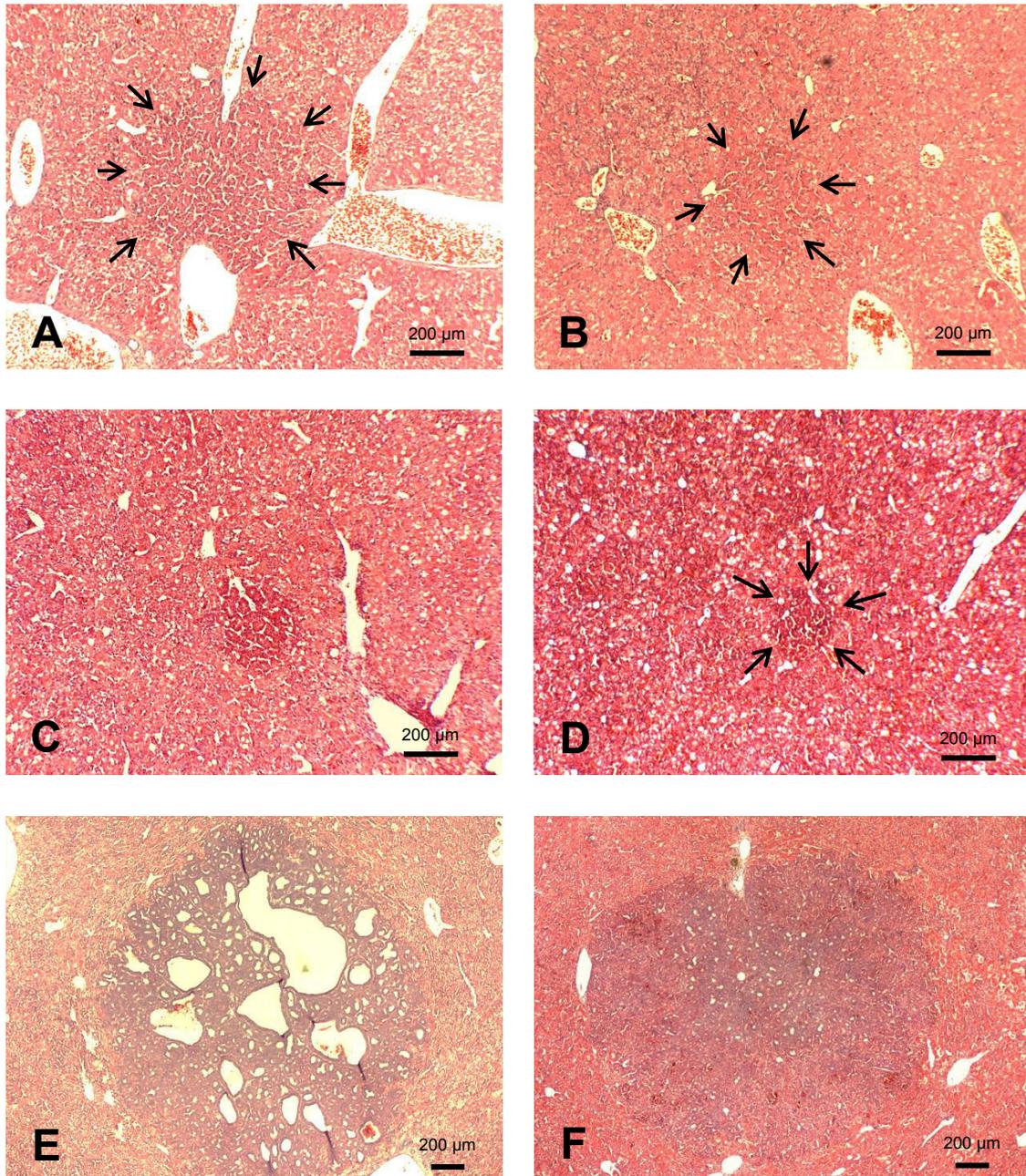


Abb. 12: FAH-Typen in embryonaler Putenleber. HE-Färbung.

(A + B) Eosinophiler FAH.

(C + D) Eosinophiler FAH mit Anfängen tubulärer Strukturen.

(E +F) Das umliegende Lebergewebe komprimierender FAH.

4.2.3 Zellproliferation und Zellverlust in fokalen hepatozellulären Veränderungen und extrafokalem Lebergewebe

Für Untersuchungen der Zellproliferation wurde die Zahl von Hepatozyten mit Mitosefiguren ermittelt. Zur Darstellung des Zellverlustes wurden unter Verwendung des TUNEL-Assays untergehende Zellen sichtbar gemacht und als „TUNEL-positiv“ gezählt und bezeichnet.

4.2.3.1 Vergleich Lebern aus unbehandelten Eiern und DEN-Eiern

Die Mitoserate der Lebern aus unbehandelten Eiern (1,4 Mitosen pro 1000 Hepatozyten) war annähernd so groß bzw. ebenso groß wie die Mitoserate des extrafokalen Lebergewebes der 2 mg DEN+DMSO- und 2 mg DEN+NaCl-Gruppe (1,8 bzw. 1,4 Mitosen pro 1000 Hepatozyten). Der Zellverlust war in Lebern der DEN-Gruppen größer als in Lebern aus unbehandelten Eiern. In unbehandelten Eiern wurden 0,7 TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten ermittelt und in Lebern der 2 mg DEN+DMSO- und 2 mg DEN+NaCl-Gruppe 1,8 bzw. 2,2 TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten. Die vollständigen Werte für Zellproliferation und -verlust in unbehandelten Eiern befinden sich in Tabelle 78 (siehe Anhang).

4.2.3.2 Vergleich fokalen hepatozellulären Veränderungen mit extrafokalem Lebergewebe

Die folgenden Untersuchungen wurden, soweit nicht anders beschrieben, an Gewebsschnitten aus DEN+DMSO-Lebern durchgeführt. Es handelt sich bei diesen Lebern um Kontrollen zu Lebern aus Eiern, die mit DEN und Sorafenib (DEN+SF) behandelt wurden. Die Untersuchungen des Effektes von Sorafenib auf fokalen hepatozellulären Veränderungen (FAH) in den DEN+SF-Versuchen wurden vor den Untersuchungen des Effektes von Cisplatin gemacht. Folglich wurden diese Kontrollen als erstes und ausführlich untersucht. Dabei wurden Zellproliferation und -verlust von FAH und extrafokalem Lebergewebe ausgewertet. Bei extrafokalem Gewebe handelt es sich um Gewebe von Leberschnitten, in denen keine FAH vorkamen oder um Bereiche eines Leberschnittes mit FAH, die nicht Teil des FAH waren.

In DEN+DMSO-Lebern waren Zellproliferation und -verlust in FAH größer als in extrafokalem Lebergewebe. Die Mitosezahl war um das 3,4-Fache erhöht und die Zahl TUNEL-positiver Zellen war rund 4,5-fach erhöht. In beiden Fällen waren die Unterschiede signifikant (t-Test, $p < 0,001$). Die gemittelten normierten Werte sind in

Abbildung 13 dargestellt und die genauen Werte finden sich in Tabelle 79 (siehe Anhang).

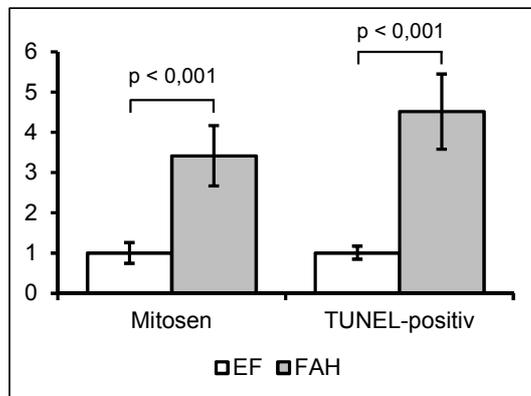


Abb. 13:

In FAH war die Anzahl Mitosen und TUNEL-positiver Zellen gegenüber extrafokalem Lebergewebe (EF) erhöht; Darstellung von Mittelwert und oberer und unterer Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, normierte Werte, t-Test.

4.2.3.3 Unterscheidung verschiedener FAH-Typen

Abhängig vom Färbeverhalten in der HE-Färbung konnten wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben drei FAH-Typen unterschieden werden – klarzellige, basophile und eosinophile FAH. Daneben konnten auch FAH danach unterschieden werden, ob sie das umliegende Lebergewebe komprimieren oder nicht.

Klarzellige FAH

Klarzellige FAH kamen sehr selten vor. Es wurden Leberschnitte aus 38 DEN+DMSO-Lebern aus zwei Versuchen und 92 DEN+NaCl-Lebern aus drei Versuchen untersucht. Dabei wurden 14 klarzellige FAH identifiziert. Die vier klarzellige FAH aus DEN+DMSO-Lebern wiesen 0,05 Mitosen pro 1000 Hepatozyten auf. Die Mitoserate war deutlich geringer als die des extrafokalen Lebergewebes (1,8 Mitosen pro 1000 Hepatozyten). In DEN+NaCl-Lebern betrug die Anzahl der Mitosen 0,06 pro 1000 Hepatozyten.

Basophile und eosinophile FAH

Die Zahl der Mitosen und TUNEL-positiver Zellen der FAH wurden auf die des extrafokalen Lebergewebes normiert. Beide FAH-Typen wiesen im Vergleich zur Umgebung eine deutlich höhere Mitoserate auf. In basophilen FAH (BCF) war diese etwa 3,5-fach erhöht. Der Unterschied war signifikant (t-Test, $p < 0,001$). In

eosinophilen FAH (ECF) war die Mitoserate verglichen mit extrafokalem Gewebe rund 3-fach höher. Der Unterschied war nicht signifikant.

Auch der Zellverlust war in BCF und ECF höher als im extrafokalen Gewebe. Der Unterschied hatte jeweils einen Faktor von rund 4,5 und war signifikant (t-Test, BCF: $p < 0,001$; ECF: $p < 0,01$).

Die genauen Werte finden sich in Tabelle 80 (siehe Anhang) und sind als normierte Werte in Abbildung 14 dargestellt.

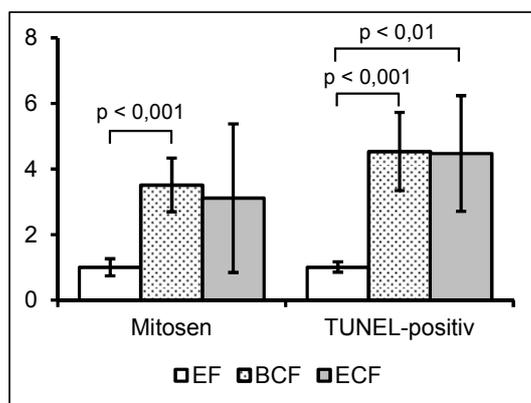


Abb. 14:

In basophilen (BCF) und eosinophilen (ECF) war die FAH Anzahl Mitosen und TUNEL-positiver Zellen gegenüber extrafokalem Lebergewebe (EF) erhöht; Darstellung von Mittelwert und oberer und unterer Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, normierte Werte, t-Test.

Nicht komprimierende und komprimierende FAH

Zellproliferation und -verlust war bei beiden hier betrachteten FAH-Typen im Vergleich zum extrafokalen Lebergewebe größer. FAH, die das umliegende Lebergewebe komprimierten [FAH(k)] zeigten eine höhere Mitoserate als FAH, die das umliegende Lebergewebe nicht komprimierten [FAH(nk)]. Im Vergleich zum extrafokalen Gewebe war die Mitoserate von FAH(nk) 2,9-fach höher (signifikant unterschiedlich, t-Test, $p < 0,001$). Auch die Mitoserate von FAH(k) war im Vergleich zu der im extrafokalen Gewebe erhöht – um das 5,5-Fache (signifikant unterschiedlich, t-Test, $p < 0,01$).

Die Zahl TUNEL-positiver Zellen dagegen war in FAH(k) geringer als in FAH(nk). Verglichen mit dem extrafokalen Gewebe war sie in FAH(nk) 4,8-fach höher (signifikant unterschiedlich, t-Test, $p < 0,001$) bzw. in FAH(k) 3,3-fach höher (signifikant unterschiedlich, t-Test, $p < 0,05$).

Die normierten Werte sind in Abbildung 15 dargestellt und die genauen Werte sind in Tabelle 81 (siehe Anhang) zu finden.

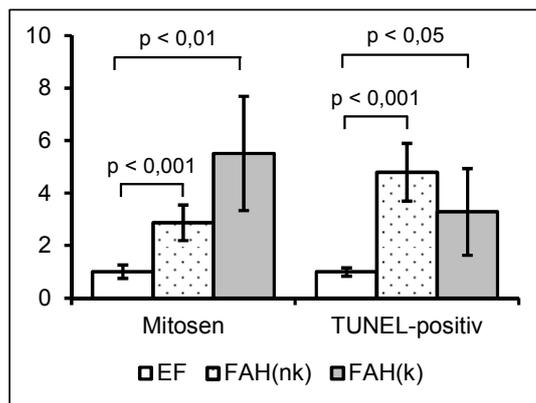


Abb. 15:

In nicht komprimierenden [FAH(nk)] und komprimierenden [FAH(k)] FAH war die Anzahl Mitosen und TUNEL-positiver Zellen gegenüber extrafokalem Lebergewebe (EF) erhöht; Darstellung von Mittelwert und oberer und unterer Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, normierte Werte, t-Test.

4.3 Effekte durch Sorafenib

Für die Induktion der FAH innerhalb der embryonalen Putenleber erfolgte am ersten Versuchstag (d0) die Injektion von 2 mg DEN pro Ei. An d8 wurde eine bestimmte Dosis Sorafenib (DEN+SF-Gruppe) und als Kontrolle DMSO (DEN+DMSO-Gruppe) gespritzt. Der Effekt von Sorafenib wurde in zwei unabhängigen Versuchen (DS 1 und DS 2) analysiert. Für beide Versuche wurde die Überlebensrate in den jeweiligen Versuchsgruppen und das Embryo- bzw. Lebergewicht ermittelt.

Im ersten Versuch (DS 1) wurden weiterhin die Morphometriedaten der beobachteten fokalen hepatozellulären Veränderungen (FAH) ermittelt und die FAH durch die Analyse von Zellproliferation und -verlust durch Zählen von Mitosefiguren und TUNEL-positiven Zellen weiter untersucht.

Im Versuch DS 2 wurden ebenfalls Morphometriedaten der beobachteten FAH erhoben, die den Befund aus Versuch DS 1 bestätigten. In diesem Versuch wurden zudem die Auswirkungen einer niedrigeren Sorafenibdosis untersucht.

4.3.1 Einfluss von Sorafenib auf Putenembryonen

4.3.1.1 Einfluss von Sorafenib auf die Überlebensrate

Bei Embryonen, die an Versuchstag 0 mit DEN behandelt wurden, wurde die Überlebensrate durch die Folgebehandlung mit 1 mg Sorafenib im Vergleich zu DMSO um rund 40 % gesenkt (Tab. 15). Dieses Ergebnis wurde in zwei Versuchen erzielt.

Dabei waren die Überlebensraten im Versuch DS 2 insgesamt besser als im Versuch DS 1.

Die zusätzliche Gabe von 0,5 mg Sorafenib hatte im Vergleich zur DMSO-Gabe keinen Einfluss auf das Überleben von Embryonen, die am Versuchstag 0 mit DEN behandelt wurden. Die Überlebensraten bezogen auf den gesamten Versuchszeitraum (d0 bis d24) waren etwas geringer als bezogen auf den Zeitpunkt der Sorafenib- bzw. DMSO-Behandlung (d8 bis d24).

Tab. 15: Überlebensrate der Embryonen in DEN+DMSO- und DEN+SF-Gruppe in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

	ÜR d8 bis d24 [%]		ÜR d0 bis d24 [%]		n Eier an d8	
	DS 1	DS 2	DS 1	DS 2	DS 1	DS 2
DEN+DMSO	65	88	63	80	23	26
DEN+(0,5 mg)SF	-	89	-	80	0	27
DEN+(1 mg)SF	40	50	38	45	25	46

ÜR = Überlebensrate, d = Versuchstag, n = Anzahl, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Unter dem zusätzlichen Einfluss von 1 mg Sorafenib verringerte sich also die Überlebensrate von Embryonen, die mit DEN behandelt wurden. Dagegen hatte die zusätzliche Gabe von 0,5 mg Sorafenib keinen Einfluss auf das Überleben.

4.3.1.2 Einfluss von Sorafenib auf Embryo- und Lebergewicht

In beiden Versuchen schien das durchschnittliche Embryogewicht unter dem Einfluss von Sorafenib geringer als in der DEN+DMSO-Vergleichsgruppe zu sein (Tab. 16). Im Versuch DS 1 war der Unterschied signifikant (t-Test, $p < 0,05$).

Tab. 16: Embryogewicht [g] in DEN+DMSO- und DEN+SF-Gruppe in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DS 1	DEN+DMSO	15	45,25	9,56	39,96 – 50,55
	DEN+(1 mg)SF	10	38,04	5,04	34,44 – 41,65
DS 2	DEN+DMSO	23	43,48	4,64	41,47 – 45,48
	DEN+(0,5 mg)SF	24	41,43	3,90	39,78 – 43,08
	DEN+(1 mg)SF	23	41,02	4,54	39,06 – 42,98

n = Anzahl Embryonen, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Das absolute Lebergewicht (Tab. 17) war im ersten Versuch unter dem Einfluss von Sorafenib minimal geringer als in der DEN+DMSO-Gruppe. Im zweiten Versuch vergrößerte sich das absolute Lebergewicht mit steigender Sorafenibdosis etwas. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Tab. 17: Lebergewicht [g] in DEN+DMSO- und DEN+SF-Gruppe in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DS 1	DEN+DMSO	15	0,82	0,11	0,76 – 0,89
	DEN+(1 mg)SF	10	0,79	0,13	0,70 – 0,88
DS 2	DEN+DMSO	23	0,74	0,13	0,69 – 0,80
	DEN+(0,5 mg)SF	24	0,75	0,08	0,71 – 0,78
	DEN+(1 mg)SF	23	0,78	0,11	0,74 – 0,83

n = Anzahl Embryonen, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Das relative Lebergewicht (Tab. 18) war in beiden Versuchen in der DEN+DMSO-Gruppe am geringsten und unter Sorafenibeinfluss größer. Im zweiten Versuch stieg das relative Lebergewicht mit steigender Sorafenibdosis. Dabei waren die Unterschiede nur im zweiten Versuch beim Vergleich der DEN+DMSO- und DEN+(1 mg)SF-Gruppe signifikant (t-Test, $p < 0,01$).

Tab. 18: Relatives Lebergewicht [%] in DEN+DMSO- und DEN+SF-Gruppe in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DS 1	DEN+DMSO	15	1,88	0,45	1,63 – 2,14
	DEN+(1 mg)SF	10	2,08	0,26	1,90 – 2,27
DS 2	DEN+DMSO	23	1,70	0,22	1,61 – 1,80
	DEN+(0,5 mg)SF	24	1,81	0,18	1,73 – 1,88
	DEN+(1 mg)SF	23	1,92	0,29	1,80 – 2,05

n = Anzahl Embryonen/Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Zusammenfassend verringerte sich das Embryogewicht unter dem Einfluss von 1 mg Sorafenib in beiden Versuchen. Für das absolute Lebergewicht gab es keinen eindeutigen Effekt. In beiden Versuchen war das relative Lebergewicht in der DEN+(1 mg)SF- Gruppe größer als in der DEN+DMSO-Gruppe.

Zudem wurde das Embryo-, Leber- und relative Lebergewicht der DEN+DMSO- bzw. DEN+(1 mg)SF-Gruppe beider Versuche verglichen. Die jeweiligen Werte wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchen auf. Die Reproduzierbarkeit dieser untersuchten Eigenschaften belegt, dass die Durchführung der hier angewandten Methode trotz anzunehmender interindividueller Unterschiede zu konsistenten und vergleichbaren Ergebnissen führte.

4.3.2 Einfluss von Sorafenib auf Zellproliferation und -verlust in extrafokalem Lebergewebe

Die Anzahl Mitosen und TUNEL-positiver Zellen wurden im ersten Versuch ermittelt. Im extrafokalen Lebergewebe war die Mitoserate in DEN+(1 mg)SF-Lebern etwa gleich der in DEN+DMSO-Lebern. Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen war nach Einfluss von 1 mg Sorafenib signifikant höher verglichen mit DEN+DMSO-Lebern (t-Test, $p < 0,05$). Die genauen Werte sind in Tabelle 19 aufgeführt und in Abbildung 17 A dargestellt.

Tab. 19: Einfluss von Sorafenib auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in extrafokalem Lebergewebe. Daten ermittelt aus Versuch DS 1.

	Mitosen		TUNEL-positiv	
	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF
MW	1,80	1,52	1,77	3,12
SD	0,84	0,62	0,51	2,31
KI	1,34 – 2,27	1,07 – 1,96	1,49 – 2,06	1,47 – 4,77
n_L (n_S)	15 (73)	10 (46)	15 (73)	10 (46)
MW normiert	1,00	0,84	1,00	1,76
KI	0,74 – 1,26	0,59 – 1,09	0,84 – 1,16	0,83 – 2,69

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n_L = Anzahl Lebern, n_S = Anzahl Leberschnitte, MW normiert = MW in DEN+(1 mg)SF-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+(DMSO)-Gruppe.

4.3.3 Einfluss von Sorafenib auf FAH

In zwei Versuchen wurden in der DEN+DMSO-Gruppe 151 Leberschnitte von insgesamt 38 Lebern auf fokale hepatozelluläre Veränderungen (FAH) untersucht und 135 FAH beschrieben. In der DEN+(1 mg)SF-Gruppe wurden 147 Leberschnitte von 31 Lebern untersucht und 276 FAH beobachtet. Innerhalb des jeweiligen Versuches wurden die DEN+DMSO- und die DEN+SF-Gruppe verglichen.

4.3.3.1 Morphometrische Quantifizierung der FAH

Auf Basis der gemessenen Flächen der ausgewerteten Leberschnitte und der detektierten FAH-Anschnitte wurden morphometrische Quantifizierungen der FAH durchgeführt.

Flächenanteil der FAH unter Einfluss von Sorafenib

Unter Einfluss von 1 mg Sorafenib vergrößerte sich die Fläche, die FAH von der ausgewerteten Leberfläche eines Embryos ausmachten, in beiden durchgeführten Versuchen (Tab. 20 und Abb. 16 A). Im ersten Versuch wurde der Flächenanteil mehr als verdoppelt. Im zweiten Versuch fand sogar eine Steigerung um das 4,6-Fache statt. Dieser Unterschied war signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,01$). Die Dosis von 0,5 mg Sorafenib hatte keine Wirkung auf den Flächenanteil der FAH.

Tab. 20: Einfluss von Sorafenib auf die Fläche der FAH [μm^2] in 1 mm^2 Lebergewebe in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

	DS 1		DS 2		
	DEN+ DMSO	DEN+ (1 mg)SF	DEN+ DMSO	DEN+ (0,5 mg)SF	DEN+ (1 mg)SF
MW	921	1992	1257	1412	5719
SD	1781	3555	2065	2514	5937
KI	-65 – 1907	-551 – 4535	364 – 2150	350 – 2473	3018 – 8421
n_L (n_S)	15 (74)	10 (49)	23 (107)	24 (108)	21 (98)
MW normiert	1	2,16	1	1,12	4,55
KI	-0,07 – 2,07	-0,60 – 4,92	0,29 – 1,71	0,28 – 1,97	2,40 – 6,70

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n_L = Anzahl Lebern, n_S = Anzahl Leberschnitte, MW normiert = MW in DEN+SF-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+(DMSO)-Gruppe.

Anzahl FAH-Anschnitte pro cm² Lebergewebe unter Einfluss von Sorafenib

Durch 1 mg Sorafenib erhöhte sich die Anzahl FAH-Anschnitte pro ausgewerteter Leberfläche (cm²) eines Embryos im Versuch DS 1 um das 2,5-Fache und im Versuch DS 2 um das 2,3-Fache (Tab. 21 und Abb. 16 B). Im Versuch DS 2 war der Unterschied zwischen DEN+DMSO- und DEN+(1 mg)SF-Lebern signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Die Dosis von 0,5 mg Sorafenib hatte keinen Effekt.

Tab. 21: Einfluss von Sorafenib auf die Anzahl der FAH-Anschnitte pro cm² Lebergewebe in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

	DS 1		DS 2		
	DEN+ DMSO	DEN+ (1 mg)SF	DEN+ DMSO	DEN+ (0,5 mg)SF	DEN+ (1 mg)SF
MW	0,27	0,67	1,26	1,10	2,92
SD	0,37	0,79	1,64	1,54	2,23
KI	0,07 – 0,47	0,11 – 1,24	0,56 – 1,97	0,45 – 1,75	1,90 – 3,93
n _L (n _S)	15 (74)	10 (49)	23 (107)	24 (108)	21 (98)
MW normiert	1	2,48	1	0,87	2,31
KI	0,25 – 1,75	0,39 – 4,57	0,44 – 1,56	0,36 – 1,38	1,50 – 3,11

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n_L = Anzahl Lebern, n_S = Anzahl Leberschnitte, MW normiert = MW in DEN+SF-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+(DMSO)-Gruppe.

Anschnittfläche der FAH unter Einfluss von Sorafenib

Im ersten Versuch war die Fläche der FAH-Anschnitte in DEN+DMSO- und DEN+(1 mg)SF-Lebern nahezu gleich. Im zweiten Versuch war unter Einfluss von 1 mg Sorafenib die Anschnittfläche der FAH um etwa das Doppelte vergrößert. Der Unterschied war signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,001$). In DEN+(0,5 mg)SF-Lebern war die FAH-Anschnittfläche nahezu gleich groß wie in DEN+DMSO-Lebern (Tab. 22 und Abb. 16 C).

Tab. 22: Einfluss von Sorafenib auf die Anschnittfläche [mm^2] der FAH in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

	DS 1		DS 2		
	DEN+ DMSO	DEN+ (1 mg)SF	DEN+ DMSO	DEN+ (0,5 mg)SF	DEN+ (1 mg)SF
MW	0,34	0,32	0,10	0,13	0,20
SD	0,58	0,64	0,18	0,28	0,36
KI	0,02 – 0,66	0,13 – 0,51	0,07 – 0,14	0,08 – 0,19	0,15 – 0,25
n	29	45	106	97	231
MW normiert	1	0,94	1	1,33	2,01
KI	0,05 – 1,95	0,37 – 1,50	0,65 – 1,35	0,78 – 1,88	1,54 – 2,47

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl FAH, MW normiert = MW in DEN+SF-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+(DMSO)-Gruppe.

Unter Einfluss von 1 mg Sorafenib vergrößerte sich der Flächenanteil, den FAH von der ausgewerteten Leberfläche ausmachte, ebenso die Anzahl FAH-Anschnitte pro cm^2 Leberfläche. Dies wurde in zwei Versuchen beobachtet. Die Dosis von 0,5 mg Sorafenib pro Ei hatte keinen merklichen Einfluss.

Bei beiden Versuchen waren die analysierten Leberschnitte der DEN+DMSO- und der jeweiligen DEN+SF-Gruppe im Mittel gleich groß (t-Test je $p > 0,05$). Während der Analyse der Leberschnitte zeigte sich jedoch ein Unterschied zwischen den Versuchen. Leberschnitte des Versuches DS 2 waren kleiner als die des Versuches DS 1 (DEN+DMSO: 148,71 bzw. 84,44 mm^2 ; DEN+(1 mg)SF: 134,40 bzw. 80,52 mm^2 ; t-Test, $p < 0,001$).

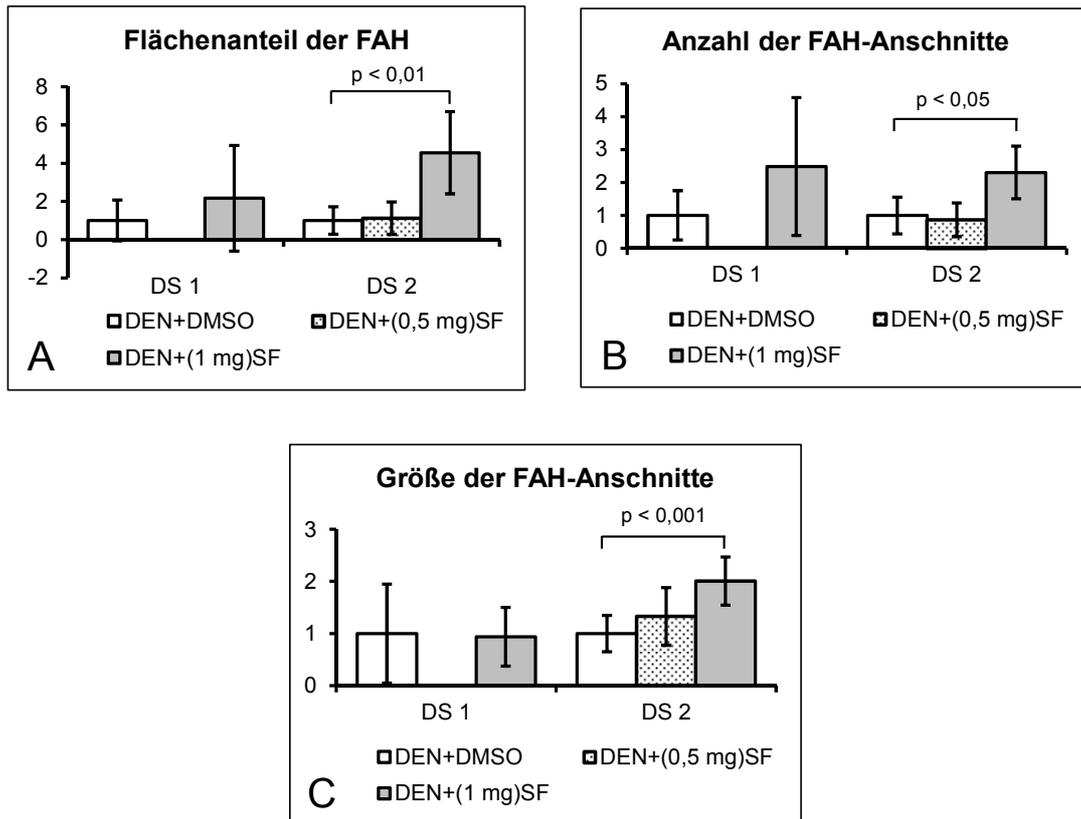


Abb. 16: Morphometrische Daten der FAH unter Einfluss von Sorafenib in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2). Darstellung von Mittelwert und oberer und unterer Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, normierte Werte, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib

(A) Flächenanteil der FAH vom Lebergewebe, Mann-Whitney-U-Test.

(B) Anzahl der FAH-Anschnitte pro cm^2 Lebergewebe, Mann-Whitney-U-Test.

(C) Größe der FAH-Anschnitte [mm^2], Mann-Whitney-U-Test.

4.3.3.2 Einfluss von Sorafenib auf Zellproliferation und -verlust in FAH

Im Folgenden wird der Effekt von 1 mg Sorafenib auf die Zahl der Mitosen und TUNEL-positiver Zellen in den induzierten FAH betrachtet. Es handelt sich dabei um die Auswertung des ersten Versuches. Zellproliferation und -verlust in den FAH waren verglichen mit den Werten innerhalb des extrafokalen Lebergewebes in DEN+DMSO-Lebern (siehe Kapitel 4.3.2) größer. Auch in DEN+(1 mg)SF-Lebern waren die Werte in FAH höher als im extrafokalen Lebergewebe (siehe Kapitel 4.3.2). Unter Sorafenib-Einfluss war die Mitoserate in FAH rund 1,4 Mal höher als in FAH von DEN+DMSO-Lebern. Der Unterschied war signifikant (t-Test, $p < 0,05$). Die Zahl TUNEL-positiver Zellen in FAH der DEN+(1 mg)SF-Gruppe war im Vergleich zur DEN+DMSO-Gruppe etwas größer (Tab. 23 und Abb. 17 B).

Tab. 23: Einfluss von Sorafenib auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in FAH. Daten ermittelt aus Versuch DS 1.

	Mitosen		TUNEL-positiv	
	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF
MW	6,15	8,88	7,95	9,11
SD	3,55	5,46	4,16	8,19
KI	4,80 – 7,51	7,24 – 10,52	6,30 – 9,59	6,65 – 11,57
n	29	45	27	45
MW normiert	1,00	1,44	1,00	1,15
KI	0,78 – 1,22	1,18 – 1,71	0,79 – 1,21	0,84 – 1,46

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl FAH, MW normiert = MW in DEN+(1 mg)SF-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+DMSO-Gruppe.

Unter Einfluss von 1 mg Sorafenib war die Mitoserate in FAH erhöht. Daneben war die Anzahl TUNEL-positiver Zellen etwas erhöht.

4.3.3.3 Zusammenhang histologischer Parameter und Zellproliferation bzw. -verlust innerhalb der FAH unter Einfluss von Sorafenib

Für die FAH-Klassifikation wurden, wie im Kapitel 3.5.2 beschrieben, verschiedene Merkmale der FAH in Zahlen ausgedrückt beschrieben. Darunter zählen die tubuläre Struktur des FAH, die Pleomorphie, das Auftreten atypischer Nuklei und prominenter

Nukleoli innerhalb des FAH und die Kompression des umliegenden Lebergewebes durch den FAH. Die durchschnittlichen Werte der beschriebenen Merkmale für FAH der DEN+DMSO- und DEN+(1 mg)SF-Gruppe des ersten DEN+SF-Versuches sind in Tabelle 82 (siehe Anhang) aufgelistet. Für diese FAH wurde für das jeweilige Merkmale überprüft, ob die Ausprägung des Merkmals mit der Höhe von Zellproliferation bzw. -verlust korreliert war. Die genauen Werte dazu sind in Tabelle 70 (siehe Anhang) umfassend und in Tabelle 24 vereinfacht dargestellt.

FAH in DEN+DMSO-Lebern, die eine tubuläre Struktur aufwiesen, schienen auch eine höhere Mitoserate zu haben, FAH mit atypischen Nuklei dagegen eine verminderte Zahl TUNEL-positiver Zellen. Besonders auffällig war die Korrelation in Bezug auf den histologischen Parameter „Kompression des umliegenden Gewebes“. FAH, die das umliegende Lebergewebe komprimierten, hatten eine deutlich höhere Zahl Mitosen und deutlich verminderte Zahl TUNEL-positiver Zellen.

Auch in Lebern der DEN+(1 mg)SF-Gruppe schienen FAH, die das umliegende Gewebe komprimierten eine höhere Mitoserate aufzuweisen als FAH, die keine Kompression des umliegenden Gewebes zeigten. Zudem war die Zahl TUNEL-positiver Zellen in FAH mit Kompression erhöht. FAH mit vermehrt pleomorphen Hepatozyten oder vermehrt prominenten Nukleoli hatten einen geringeren Zellverlust gegenüber FAH ohne diese Eigenschaften. FAH mit vermehrt atypischen Nuklei wiesen einen erhöhten Zellverlust auf.

Tab. 24: Zusammenhang von histologischen Parametern und der Anzahl Mitosen bzw. TUNEL-positiver Hepatozyten in FAH in DEN+DMSO- und DEN+(1 mg)SF-Lebern; Daten ermittelt aus Versuch DS 1.

	DEN+DMSO		DEN+(1 mg)SF	
	Mitose	TUNEL-positiv	Mitose	TUNEL-positiv
tubuläre Struktur	+	k. Z.	k. Z.	k. Z.
Pleomorphie	k. Z.	k. Z.	k. Z.	-
atypische Nuklei	k. Z.	-	k. Z.	+
prominente Nukleoli	k. Z.	k. Z.	k. Z.	-
Kompression des umliegenden Gewebes	+++	--	+	++

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, k. Z. = kein Zusammenhang, „+“ bzw. „-“ = geringer Zusammenhang, „++“ = mittel starker Zusammenhang, „+++“ = starker Zusammenhang.

4.3.4 Einfluss von Sorafenib auf basophile und eosinophile FAH

Abhängig von der Klassifikation in den Parametern zytoplasmatische Basophilie und Eosinophilie wurden die FAH wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben in basophile (BCF) und eosinophile (ECF) FAH eingeteilt. Diese wurden in den Versuchen DS 1 und DS 2 morphometrisch quantifiziert. Für Versuch DS 1 wurden zudem Analysen von Zellproliferation und -verlust durch Zählen von Mitosefiguren und TUNEL-positiven Zellen durchgeführt.

4.3.4.1 Verteilung von BCF und ECF unter Einfluss von Sorafenib

Sowohl in DEN+DMSO-Lebern als auch in DEN+SF-Lebern beider Versuche gab es numerisch deutlich mehr basophile als eosinophile FAH (Tab. 25). Der Anteil basophiler FAH wurde unter Einfluss von 1 mg Sorafenib in beiden Versuchen vergrößert, während sich der von eosinophilen FAH verringerte. Durch 0,5 mg Sorafenib wurde keine Veränderung des prozentualen Anteils der FAH-Typen gegenüber DEN+DMSO-Lebern hervorgerufen.

Tab. 25: Einfluss von Sorafenib auf die Verteilung von basophilen und eosinophilen FAH. Daten ermittelt aus zwei Versuchen (DS 1 und DS 2); Angabe von prozentualen Anteil und Anzahl der FAH.

Versuch	FAH-Typ	DEN+DMSO	DEN+(0,5 mg)SF	DEN+(1 mg)SF
DS 1	BCF	76 % (22)		91 % (41)
	ECF	24 % (7)		9 % (4)
DS 2	BCF	73 % (77)	73 % (71)	89 % (206)
	ECF	27 % (29)	27 % (26)	11 % (25)

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, BCF = basophile fokale hepatozelluläre Veränderung, ECF = eosinophile fokale hepatozelluläre Veränderung.

Durch 1 mg Sorafenib wurde der Anteil basophiler FAH vergrößert und der eosinophiler FAH verringert.

4.3.4.2 Morphometrische Quantifizierung von BCF und ECF

Flächenanteil von BCF und ECF unter Einfluss von Sorafenib

Die Fläche, die basophile FAH (BCF) von der ausgewerteten Leberfläche ausmachte, war größer als die von eosinophilen FAH (ECF). In DEN+(1 mg)SF-Lebern war der Unterschied signifikant (Mann-Whitney-U-Test, Versuch DS 1 $p < 0,05$ und Versuch DS 2 $p < 0,001$). In beiden Versuchen vergrößerte sich der Flächenanteil basophiler FAH unter Behandlung mit 1 mg Sorafenib deutlich – im ersten Versuch um das 2,4-Fache und im zweiten Versuch um das 6,6-Fache (Tab. 26). Der Unterschied war im zweiten Versuch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,001$). Auf den Flächenanteil eosinophiler FAH hatte 1 mg Sorafenib keinen Effekt (Tab. 27). Die geringere Dosis von 0,5 mg Sorafenib hatte keinen Effekt auf den Flächenanteil von basophilen als auch von eosinophilen FAH.

Tab. 26: Einfluss von Sorafenib auf die Fläche basophiler FAH [μm^2] in 1 mm² Lebergewebe in zwei Versuchen, (DS 1 und DS 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DS 1	DEN+DMSO	15	812	1722	-142 – 2676
	DEN+(1 mg)SF	10	1914	3463	-564 – 4391
DS 2	DEN+DMSO	23	968	1932	132 – 1803
	DEN+(0,5 mg)SF	24	1071	1870	272 – 1870
	DEN+(1 mg)SF	21	6358	7976	2728 – 9989

n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Tab. 27: Einfluss von Sorafenib auf die Fläche eosinophiler FAH [μm^2] in 1 mm² Lebergewebe in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DS 1	DEN+DMSO	15	109	213	-9 – 331
	DEN+(1 mg)SF	10	78	183	-53 – 210
DS 2	DEN+DMSO	23	286	774	-40 – 613
	DEN+(0,5 mg)SF	24	341	936	-55 – 736
	DEN+(1 mg)SF	21	288	496	62 – 513

n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Anzahl FAH-Anschnitte von BCF und ECF pro cm² Lebergewebe unter Einfluss von Sorafenib

In DEN+DMSO- und DEN+SF-Lebern gab es deutlich mehr Anschnitte basophiler als eosinophiler FAH. Die Unterschiede waren in der DEN+(1 mg)SF-Gruppe beider Versuche signifikant (Mann-Whitney-U-Test, DS 1: $p < 0,05$; DS 2: $p < 0,001$).

Die Anzahl Anschnitte basophiler FAH vergrößerte sich unter Einfluss von 1 mg Sorafenib (signifikant unterschiedlich, Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,01$), während die Anzahl Anschnitte eosinophiler FAH gleich blieb. Die Behandlung mit 0,5 mg Sorafenib hatte keinen Einfluss auf die Anzahl Anschnitte basophiler und eosinophiler FAH. Die genauen Werte finden sich in Tabelle 28 und Tabelle 29.

Tab. 28: Einfluss von Sorafenib auf die Anzahl der Anschnitte basophiler FAH pro cm² Lebergewebe in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DS 1	DEN+DMSO	15	0,20	0,31	0,03 – 0,48
	DEN+(1 mg)SF	10	0,61	0,72	0,10 – 1,13
DS 2	DEN+DMSO	23	0,92	1,47	0,29 – 1,56
	DEN+(0,5 mg)SF	24	0,81	1,18	0,31 – 1,31
	DEN+(1 mg)SF	21	2,59	2,01	1,67 – 3,50

n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Tab. 29: Einfluss von Sorafenib auf die Anzahl der Anschnitte eosinophiler FAH pro cm² Lebergewebe in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DS 1	DEN+DMSO	15	0,07	0,11	0,01 – 0,18
	DEN+(1 mg)SF	10	0,06	0,14	-0,04 – 0,16
DS 2	DEN+DMSO	23	0,34	0,47	0,14 – 0,55
	DEN+(0,5 mg)SF	24	0,29	0,48	0,08 – 0,49
	DEN+(1 mg)SF	21	0,34	0,38	0,16 – 0,51

n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Anschnittfläche von BCF und ECF unter Einfluss von Sorafenib

In der DEN+(1 mg)SF-Gruppe beider Versuche und in der DEN+DMSO-Gruppe von DS 1 war die Anschnittfläche basophiler FAH größer als die eosinophiler FAH. Der Unterschied in der DEN+(1 mg)SF-Gruppe war jeweils signifikant (Mann-Whitney-U-Test, DS 1: $p < 0,01$; DS 2: $p < 0,05$). In der DEN+DMSO- und DEN+(0,5 mg)SF-Gruppe von des zweiten Versuches waren basophile und eosinophile FAH nahezu gleich groß.

Ein eindeutiger Effekt von Sorafenib auf die Größe der Anschnittflächen basophiler (Tab. 30) bzw. eosinophiler FAH (Tab. 31) war nicht zu erkennen. Im ersten Versuch war in DEN+(1 mg)SF-Lebern verglichen mit DEN+DMSO-Lebern die durchschnittliche Anschnittfläche basophiler FAH annähernd gleich. Im zweiten Versuch dagegen waren Anschnitte basophiler FAH unter Einfluss von 1 mg Sorafenib etwas größer. Dieser Unterschied war signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,001$). Die Behandlung mit 0,5 mg Sorafenib hatte keinen Einfluss auf die Fläche der FAH-Anschnitte basophiler und eosinophiler FAH.

Tab. 30: Einfluss von Sorafenib auf die Anschnittfläche [mm^2] der basophilen FAH in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DS 1	DEN+DMSO	22	0,40	0,66	0,11 – 0,96
	DEN+(1 mg)SF	41	0,34	0,67	0,13 – 0,55
DS 2	DEN+DMSO	77	0,11	0,20	0,06 – 0,51
	DEN+(0,5 mg)SF	71	0,14	0,28	0,07 – 0,20
	DEN+(1 mg)SF	206	0,22	0,38	0,17 – 0,27

n = Anzahl FAH, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Tab. 31: Einfluss von Sorafenib auf die Anschnittfläche [mm²] der eosinophilen FAH in zwei Versuchen (DS 1 und DS 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DS 1	DEN+DMSO	7	0,16	0,08	0,08 – 0,16
	DEN+(1 mg)SF	4	0,14	0,03	0,09 – 0,19
DS 2	DEN+DMSO	30	0,09	0,12	0,04 – 0,13
	DEN+(0,5 mg)SF	27	0,12	0,26	0,02 – 0,22
	DEN+(1 mg)SF	25	0,08	0,13	0,03 – 0,14

n = Anzahl FAH, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

Der Flächenanteil basophiler FAH wurde durch 1 mg Sorafenib vergrößert, während der von eosinophilen FAH gleich blieb. Unter Einfluss von 1 mg Sorafenib war die Anzahl der Anschnitte basophiler FAH vergrößert, während die eosinophiler FAH gleich blieb und auf die Anschnittfläche basophiler und eosinophiler FAH hatte 1 mg Sorafenib keinen eindeutigen Effekt.

4.3.4.3 Zellproliferation und -verlust in BCF und ECF

Durch die Behandlung mit 1 mg Sorafenib schien die Mitoserate in basophilen FAH gesteigert worden zu sein. Die Zahl TUNEL-positiver Zellen schien unverändert (Tab. 32 und Abb. 17 C).

Die Mitoserate schien durch 1 mg Sorafenib in eosinophiler FAH etwas verringert worden zu sein und die Zahl TUNEL-positiver Zellen zeigte scheinbar keinen Unterschied (Tab. 33 und Abb. 17 D). Die benannten Unterschiede waren nicht signifikant.

Tab. 32: Einfluss von Sorafenib auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in basophilen FAH. Daten ermittelt aus Versuch DS 1.

	Mitosen		TUNEL-positiv	
	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF
MW	6,33	9,27	7,98	9,03
SD	3,34	5,54	4,48	7,87
KI	4,85 – 7,81	7,52 – 11,02	5,88 – 10,07	6,55 – 11,52
n	22	41	20	41
MW normiert	1,00	1,46	1,00	1,13
KI	0,77 – 1,23	1,19 – 1,74	0,74 – 1,26	0,82 – 1,44

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl FAH, MW normiert = MW in DEN+(1 mg)SF-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+DMSO-Gruppe.

Tab. 33: Einfluss von Sorafenib auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in eosinophilen FAH. Daten ermittelt aus Versuch DS 1.

	Mitosen		TUNEL-positiv	
	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF
MW	5,61	4,38	7,87	8,79
SD	4,41	0,81	3,36	11,47
KI	1,52 – 9,69	3,09 – 5,67	4,76 – 10,97	-9,45 – 27,04
n	7	4	7	4
MW normiert	1,00	0,78	1,00	1,12
KI	0,27 – 1,73	0,55 – 1,01	0,59 – 1,41	-1,20– 3,44

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl FAH, MW normiert = MW in DEN+(1 mg)SF-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+DMSO-Gruppe.

Sorafenib schien die Mitoserate in basophilen FAH zu erhöhen und sie in eosinophilen FAH gering herabzusetzen.

4.3.5 Einfluss von Sorafenib auf nicht komprimierende und komprimierende FAH

Abhängig von der Klassifikation, ob der FAH das umliegende Lebergewebe komprimiert, wurden die FAH wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben in das umliegende Gewebe komprimierend [Foci of altered hepatocytes, komprimierend, FAH(k)] und das umliegende Gewebe nicht komprimierend [Foci of altered hepatocytes, nicht komprimierend, FAH(nk)] eingeteilt. Diese FAH wurden im ersten DEN+SF-Versuch (DS 1) morphometrisch quantifiziert und es wurden Analysen von Zellproliferation und -verlust durch Zählen von Mitosefiguren und TUNEL-positiven Zellen durchgeführt.

4.3.5.1 Verteilung von FAH(nk) und FAH(k) unter Einfluss von Sorafenib

Innerhalb beider Versuchsgruppen war bei der Mehrzahl der FAH keine Kompression des umliegenden Lebergewebes zu erkennen. Nur einige FAH zeigten eine Kompression des umliegenden Gewebes.

Unter Einfluss von 1 mg Sorafenib verringerte sich der Anteil nicht komprimierender FAH und komprimierende FAH nahmen zu (Tab. 34).

Tab. 34: Einfluss von Sorafenib auf die Verteilung von nicht komprimierenden und komprimierenden FAH im Versuch DS 1; Angabe von prozentualem Anteil und Anzahl der FAH.

FAH-Typ	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF
FAH(nk)	80 % (23)	60 % (27)
FAH(k)	20 % (6)	40 % (18)

FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

4.3.5.2 Morphometrische Quantifizierung von FAH(nk) und FAH(k) unter Einfluss von Sorafenib

Flächenanteil von FAH(nk) und FAH(k) unter Einfluss von Sorafenib

In DEN+DMSO-Lebern war die Fläche, die komprimierende FAH von der ausgewerteten Leberfläche ausmachte, etwa gleich der von nicht komprimierenden FAH (Tab. 35). In DEN+(1 mg)-SF-Lebern war die Fläche von komprimierender FAH rund 1,7 Mal größer als die von nicht komprimierenden FAH. Der Flächenanteil beider FAH-

Typen vergrößerte sich unter Einfluss von 1 mg Sorafenib. Keiner der etwaigen Unterschiede war signifikant.

Tab. 35: Einfluss von Sorafenib auf die Fläche von nicht komprimierenden und komprimierenden FAH [μm^2] in 1 mm^2 Lebergewebe. Daten ermittelt aus Versuch DS 1.

FAH-Typ	Gruppe	n	MW	SD	KI
FAH(nk)	DEN+DMSO	15	450	794	10 – 889
	DEN+(1 mg)SF	10	737	1027	2 – 1472
FAH(k)	DEN+DMSO	15	471	1486	-351 – 1294
	DEN+(1 mg)SF	10	1255	3055	-930 – 3440

FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls.

Anzahl FAH-Anschnitte von FAH(nk) und FAH(k) pro cm^2 Lebergewebe unter Einfluss von Sorafenib

Pro cm^2 Lebergewebe wurden in DEN+DMSO- und in DEN+(1 mg)SF-Lebern mehr nicht komprimierende als komprimierende FAH angeschnitten (Tab. 36). Die Anzahl angeschnittener nicht komprimierender und komprimierender FAH pro cm^2 Lebergewebe war unter Einfluss von 1 mg Sorafenib größer. Keiner der Unterschiede war signifikant.

Tab. 36: Einfluss von Sorafenib auf die Anzahl der Anschnitte von nicht komprimierenden und komprimierenden FAH pro cm^2 Lebergewebe. Daten ermittelt aus Versuch DS 1.

FAH-Typ	Gruppe	n	MW	SD	KI
FAH(nk)	DEN+DMSO	15	0,21	0,32	0,04 – 0,39
	DEN+(1 mg)SF	10	0,40	0,48	0,06 – 0,74
FAH(k)	DEN+DMSO	15	0,06	0,13	-0,01 – 0,13
	DEN+(1 mg)SF	10	0,28	0,40	-0,01 – 0,56

FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls.

Anschnittfläche von FAH(nk) und FAH(k) unter Einfluss von Sorafenib

Die Anschnittfläche von komprimierenden FAH war in beiden Versuchsgruppen deutlich größer als die von nicht komprimierenden FAH (Tab. 37). In der DEN+DMSO-Gruppe war der Unterschied signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,001$). Durch 1 mg Sorafenib verringerte sich die Anschnittfläche von komprimierenden FAH. Der Unterschied war signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Die Anschnittfläche von nicht komprimierenden FAH blieb durch Sorafenib unverändert.

Tab. 37: Einfluss von Sorafenib auf die Anschnittfläche [mm^2] von nicht komprimierenden und komprimierenden. Daten ermittelt aus Versuch DS 1.

FAH-Typ	Gruppe	n	MW	SD	KI
FAH(nk)	DEN+DMSO	23	0,21	0,24	0,10 – 0,31
	DEN+(1 mg)SF	27	0,19	0,17	0,12 – 0,26
FAH(k)	DEN+DMSO	6	0,86	1,12	-0,32 – 2,03
	DEN+(1 mg)SF	18	0,52	0,98	0,03 – 1,00

FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, n = Anzahl FAH, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls.

Sowohl der prozentuale Flächenanteil, als auch die Anzahl von FAH(nk) und FAH(k) schienen sich unter Einfluss von 1 mg Sorafenib zu vergrößern. Zudem verringerte sich die Anschnittfläche von FAH(k) unter Einfluss von 1 mg Sorafenib.

Zellproliferation und -verlust in FAH(nk) und FAH(k) unter Einfluss von Sorafenib

Der Einfluss von Sorafenib führte bei nicht komprimierenden und komprimierenden FAH zu unterschiedlichen Effekten. In nicht komprimierenden FAH erhöhte Sorafenib die Mitoserate deutlich (Faktor +1,6), während die Zahl TUNEL-positiver Zellen gering vermindert war (Tab. 38 und Abb. 17 E). Dies ist im Einklang mit der vorher beschriebenen Vermehrung der Population nicht komprimierender FAH unter Einfluss von 1 mg Sorafenib. Der Unterschied in der Mitoserate war signifikant (t-Test, $p < 0,05$). Im Gegensatz dazu blieb in komprimierenden FAH unter Einfluss von 1 mg Sorafenib die Mitoserate unverändert, während die Zahl TUNEL-positiver Zellen

um das Doppelte gesteigert worden zu sein schien (Tab. 39 und Abb. 17 F). Der Unterschied in der Zahl TUNEL-positiver Zellen war signifikant (t-Test, $p < 0,01$).

Tab. 38: Einfluss von Sorafenib auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in nicht komprimierenden FAH. Daten ermittelt aus Versuch DS 1.

	Mitosen		TUNEL-positiv	
	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF
MW	5,17	8,28	8,44	6,84
SD	2,82	5,31	4,36	7,03
KI	3,95 – 6,39	6,18 – 10,38	6,51 – 10,37	4,06 – 9,62
n	23	27	22	27
MW normiert	1,00	1,60	1,00	0,81
KI	0,76 – 1,24	1,20 – 2,01	0,77 – 1,23	0,48 – 1,14

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl FAH, MW normiert = MW in DEN+(1 mg)SF-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+DMSO-Gruppe.

Tab. 39: Einfluss von Sorafenib auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in komprimierenden FAH. Daten ermittelt aus Versuch DS 1.

	Mitosen		TUNEL-positiv	
	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF	DEN+DMSO	DEN+(1 mg)SF
MW	9,93	9,76	5,78	12,53
SD	3,74	5,71	2,34	8,80
KI	6,01 – 13,86	6,92 – 12,61	2,88 – 8,69	8,15 – 16,90
n	6	18	5	18
MW normiert	1,00	0,98	1,00	2,17
KI	0,60 – 1,40	0,70 – 1,27	0,50 – 1,50	1,41 – 2,92

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl FAH, MW normiert = MW in DEN+(1 mg)SF-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+DMSO-Gruppe.

4.3.6 Nettowachstum unter Sorafenib-Einfluss

Für die Errechnung des Nettowachstums wurden die Angaben von Zellproliferation und -verlust in Beziehung gesetzt. Tabelle Tab. 40 zeigt, welchen Einfluss die Behandlung mit Sorafenib auf das Nettowachstum der verschiedenen Veränderungen hatte. Alle FAH zeigten ein deutlich höheres Nettowachstum als das extrafocale Lebergewebe. In der DEN+DMSO-Gruppe war das Nettowachstum in basophilen FAH etwas größer als in eosinophilen FAH. Unter Sorafenib-Einfluss war dieser Unterschied weitaus deutlicher. In DEN+DMSO-Lebern hatten die das umliegende Lebergewebe komprimierenden FAH ein deutlich größeres Wachstum als nicht komprimierende FAH. Dies was in der DEN+(1 mg)SF-Gruppe nicht zu finden. Eine erweiterte Tabelle mit den jeweiligen Standardabweichungen und Anzahlen der Proben findet sich im Anhang (Tab. 83).

Tab. 40: Einfluss von Sorafenib auf das Nettowachstum (Zellen pro 24 h) des extrafokalen Lebergewebes, FAH, basophiler und eosinophiler FAH, nicht komprimierender und komprimierender FAH des Versuches DS 1; Angabe des Mittelwertes.

	EF	FAH	BCF	ECF	FAH(nk)	FAH(k)
DEN+DMSO	46,47	138,27	143,21	124,18	105,31	283,34
DEN+(1 mg)SF	36,92	198,72	210,71	69,80	193,79	206,10

EF = extrafokales Lebergewebe, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, BCF = basophiler FAH, ECF = eosinophiler FAH, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

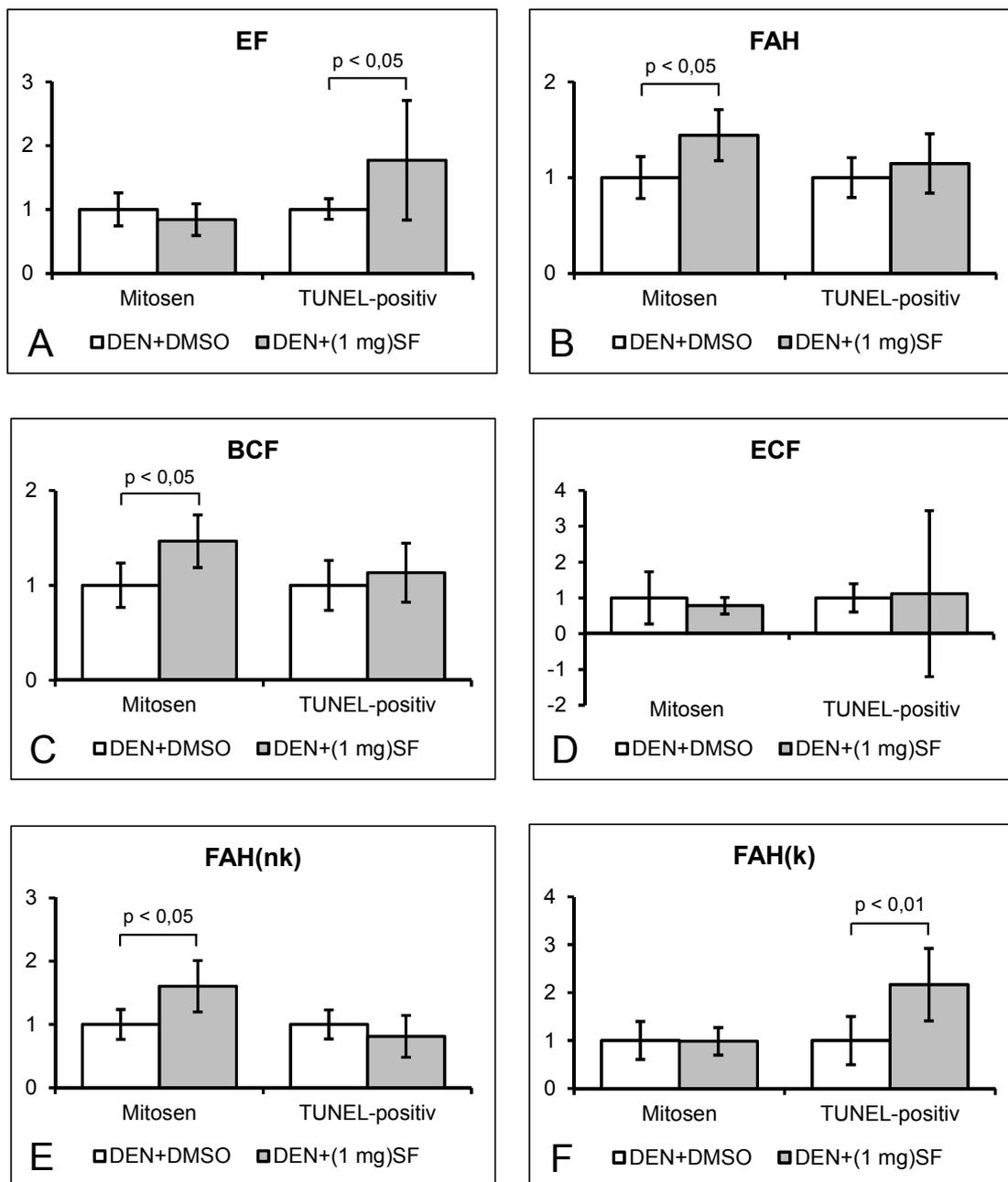


Abb. 17: Einfluss von Sorafenib auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in extrafokalem Lebergewebe und FAH, Darstellung von Mittelwert und oberer und unterer Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, normierte Werte. DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib.

(A) Extrafokales Lebergewebe, t-Test.

(B) Fokale hepatozelluläre Veränderungen, t-Test.

(C) Basophile fokale hepatozelluläre Veränderungen, t-Test.

(D) Eosinophile fokale hepatozelluläre Veränderungen.

(E) Nicht komprimierende fokale hepatozelluläre Veränderungen, t-Test.

(F) Komprimierende fokale hepatozelluläre Veränderungen, t-Test.

4.4 Effekte durch Cisplatin

Zum einen erfolgte die Bestimmung des Platingehalts in Lebern der Putenembryonen. Zum anderen wurden Effekte von Cisplatin auf Embryonen und speziell auf Veränderungen der Leber untersucht.

4.4.1 Platingehalt im Lebergewebe

Mit Hilfe der flammenlosen Atomabsorptionsspektrometrie ist die Bestimmung des Platingehalts in biologischen Proben möglich. Diese Methode diente in der vorliegenden Arbeit als Nachweis, ob das auf die CAM applizierte Cisplatin in die Leber der Putenembryonen gelangt war.

Für diese Analysen verwendete Lebern entstammten Embryonen, denen am Versuchstag 20 je 1 mg Cisplatin oder an Versuchstag 23 je 1 bzw. 2 mg Cisplatin auf die CAM-appliziert worden war. Der Versuch wurde an Versuchstag 24 beendet. Lebern aus unbehandelten Eiern dienten als Kontrolle und, wie erwartet, wurde in diesen kein Platin nachgewiesen. Bei Applikation von 1 mg Cisplatin pro Ei an Versuchstag 20 oder an Versuchstag 23 konnte Platin mit einer Konzentration von 2,60 mg/L nachgewiesen werden. Wurde an Versuchstag 23 Cisplatin in einer Dosis von 2 mg pro Ei appliziert, war die Platinkonzentration mit 2,82 mg/L annähernd gleich (Tab. 41). Aus den Platinkonzentrationen ließ sich der Platingehalt und abgeleitet davon der Cisplatingehalt für das jeweils spezifische Lebergewicht berechnen. Auch diese Werte waren in allen Gruppen Cisplatin-behandelter Embryonen etwa gleich.

Weder der Zeitpunkt der Cisplatinapplikation noch die applizierte Cisplatindosis schien einen Einfluss auf die Platinkonzentration innerhalb der embryonalen Putenleber zu haben.

Tab. 41: Platingehalt in embryonaler Putenleber in unbehandelten Eiern und nach Cisplatinapplikation.

CP- Appli- kation [mg/Ei]	CP- Appli- kation	n	Platinkonzentration [mg/L]		µg Platin/ g Leber		µg Cisplatin/ g Leber	
			MW	SD	MW	SD	MW	SD
-		4	0	0	0	0	0	0
1	d20	1	2,60	0	13,02	0	20,99	0
1	d23	6	2,60	0,25	12,99	1,23	19,98	1,90
2	d23	3	2,83	0,90	14,16	4,50	21,77	6,92

CP = Cisplatin, n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, d = Versuchstag.

4.4.2 Einfluss von Cisplatin auf Putenembryonen

In zwei Versuchen wurde der Einfluss von Cisplatin (CP) auf fokale hepatozelluläre Veränderungen (FAH) in embryonalen Putenlebern untersucht. Für die Induktion der FAH wurde Puteneiern am ersten Versuchstag 2 mg DEN pro Ei gespritzt. Am Versuchstag 20 wurde Cisplatin (DEN+CP-Eier) und als Kontrolle 0,9%ige NaCl-Lösung (DEN+NaCl-Eier) appliziert.

Im ersten DEN+CP-Versuch (DC 1) wurde die aus Dosisfindungsstudien festgesetzte Cisplatinosis von 1 mg pro Ei untersucht [DEN+(1 mg)CP-Gruppe]. Daneben wurden auch die beiden niedrigeren Dosen von 0,5 und 0,25 mg Cisplatin pro Ei untersucht. Es wurden Überlebensraten, Embryo- und Lebergewicht und Häufigkeit und Größe der FAH untersucht.

Beim zweiten DEN+CP-Versuch (DC 2) wurde abermals der Einfluss von Cisplatin auf Überlebensraten, Embryo- und Lebergewicht und Häufigkeit und Größe der FAH, sowie Mitose- und Apoptoserate in FAH und extrafokalem Lebergewebe in DEN+CP-Lebern und DEN+NaCl-Lebern verglichen.

4.4.2.1 Einfluss von Cisplatin auf die Überlebensrate

Die Überlebensrate vom Zeitpunkt der Cisplatin- bzw. NaCl-Applikation (Versuchstag 20) bis zum Versuchsende (Versuchstag 24) war in beiden Versuchen in der DEN+NaCl-Gruppe und in den unteren DEN+CP-Dosisgruppen etwa gleich (Tab. 42). Gegenüber diesen Überlebensraten war die Überlebensrate nach Applikation der höchsten Cisplatindosis (1 mg pro Ei) in beiden Versuchen um etwa die Hälfte reduziert. Die Überlebensraten bezogen auf den gesamten Versuchszeitraum (Versuchstag 0 bis 24) waren etwa um die Hälfte geringer gegenüber denen von Versuchstag 20 bis 24.

Tab. 42: Überlebensrate der Embryonen in DEN+NaCl- und DEN+CP-Gruppe in zwei Versuchen. (DC 1 und DC 2)

	ÜR d20 bis d24 [%]		ÜR d0 bis d24 [%]		n Eier an d20	
	DC 1	DC 2	DC 1	DC 1	DC 2	DC 1
DEN+NaCl	74	97	37	51	47	35
DEN+(0,25 mg)CP	73	94	36	49	33	33
DEN+(0,5 mg)CP	72	81	36	43	36	32
DEN+(1 mg)CP	36	50	18	26	39	52

ÜR = Überlebensrate, d = Versuchstag, n = Anzahl, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

4.4.2.2 Einfluss von Cisplatin auf Embryo- und Lebergewicht

Das Embryogewicht war in beiden Versuchen in der DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP-Gruppe am größten und nahm mit steigender Cisplatindosis etwas ab (Tab. 43). Im zweiten Versuch war der Unterschied zwischen der DEN+NaCl- und DEN+(0,5 mg)CP-Gruppe signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Der Unterschied zwischen der DEN+NaCl- und DEN+(1 mg)CP-Gruppe war in beiden Versuchen signifikant (bei DC 1 t-Test, $p < 0,05$ und bei DC 2 Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,001$).

Tab. 43: Embryogewicht [g] in DEN+NaCl- und DEN+CP-Gruppe in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DC 1	DEN+NaCl	35	40,75	5,19	38,97 – 42,54
	DEN+(0,25 mg)CP	24	40,33	3,77	38,74 – 41,39
	DEN+(0,5 mg)CP	26	38,51	4,61	36,65 – 40,38
	DEN+(1 mg)CP	14	37,25	4,87	34,44 – 40,06
DC 2	DEN+NaCl	33	41,62	4,65	39,97 – 43,27
	DEN+(0,25 mg)CP	31	41,84	4,11	40,33 – 43,35
	DEN+(0,5 mg)CP	26	38,59	5,62	36,32 – 40,86
	DEN+(1 mg)CP	26	38,44	3,85	36,89 – 40,00

n = Anzahl Embryonen, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

Im ersten Versuch schien sich das absolute Lebergewicht bei steigender Cisplatindosis etwas zu verringern (Tab. 44). Im zweiten Versuch konnte dies mit Ausnahme der Gruppe mit der höchsten Cisplatindosis bestätigt werden, in der das absolute Lebergewicht annähernd dem der DEN+NaCl-Gruppe entsprach.

Tab. 44: Lebergewicht [g] in DEN+NaCl- und DEN+CP-Gruppe in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DC 1	DEN+NaCl	35	0,63	0,11	0,59 – 0,67
	DEN+(0,25 mg)CP	24	0,61	0,12	0,56 – 0,66
	DEN+(0,5 mg)CP	26	0,60	0,11	0,55 – 0,64
	DEN+(1 mg)CP	14	0,57	0,12	0,51 – 0,64
DC 2	DEN+NaCl	33	0,64	0,11	0,60 – 0,68
	DEN+(0,25 mg)CP	31	0,62	0,11	0,57 – 0,66
	DEN+(0,5 mg)CP	26	0,60	0,16	0,54 – 0,65
	DEN+(1 mg)CP	26	0,63	0,11	0,59 – 0,68

n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

Auf das relative Lebergewicht hatte Cisplatin keinen eindeutigen Effekt (Tab. 45). Beim ersten Versuch war es mit einer Ausnahme in allen Versuchsgruppen gleich groß (1,55 %). Im zweiten Versuch war es näherungsweise in diesem Bereich und wies zwischen den Versuchsgruppen eine geringe Varianz auf. Zwischen der DEN+NaCl- und DEN+(1 mg)CP-Gruppe gab es einen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$).

Tab. 45: Relatives Lebergewicht [%] in DEN+NaCl- und DEN+CP-Gruppe in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DC 1	DEN+NaCl	35	1,55	0,19	1,48 – 1,61
	DEN+(0,25 mg)CP	24	1,51	0,27	1,40 – 1,62
	DEN+(0,5 mg)CP	26	1,55	0,23	1,46 – 1,64
	DEN+(1 mg)CP	14	1,55	0,30	1,38 – 1,72
DC 2	DEN+NaCl	33	1,54	0,26	1,45 – 1,63
	DEN+(0,25 mg)CP	31	1,47	0,23	1,39 – 1,56
	DEN+(0,5 mg)CP	26	1,55	0,30	1,44 – 1,67
	DEN+(1 mg)CP	26	1,65	0,23	1,56 – 1,74

n = Anzahl Embryonen/Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

Zusammenfassend hatte Cisplatin kaum einen Einfluss auf Embryo- und Lebergewicht. Unter dem Einfluss von 0,5 und 1 mg Cisplatin reduzierte sich das Embryogewicht geringfügig. Für das absolute und relative Lebergewicht gab es keine eindeutige Veränderung unter Einfluss von Cisplatin.

Zudem wurde das Embryo-, Leber- und relative Lebergewicht der DEN+NaCl- bzw. den jeweiligen DEN+CP-Gruppen beider Versuche verglichen. Die jeweiligen Werte wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchen auf. Die Reproduzierbarkeit dieser untersuchten Eigenschaften zeugt davon, dass die Durchführung der hier angewandten Methode trotz anzunehmender interindividueller Unterschiede zu konsistenten und vergleichbaren Ergebnissen führte.

4.4.3 Einfluss von Cisplatin auf Zellproliferation und -verlust in extrafokalem Lebergewebe

Werte für Zellproliferation und -verlust des extrafokalen Lebergewebes wurden im zweiten Versuch ermittelt. Die verschiedenen Cisplatindosen hatten unterschiedliche Effekte. Die Mitoserate war in DEN+NaCl- und DEN+(0,5 mg)CP- Lebern annähernd gleich. In DEN+(0,25 mg)CP-Lebern war sie niedriger und in DEN+(1 mg)CP-Lebern schien sie erhöht (Tab. 46 und Abb. 19 A). Die Zahl TUNEL-positiver Zellen war in DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP-Lebern annähernd gleich groß und in der Gruppe mit mittlerer und hoher Cisplatindosis schien sie erhöht zu sein (Tab. 47 und Abb. 19 A). Die Werte von Mitoserate und Anzahl TUNEL-positiver Zellen der Cisplatin-Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur NaCl-Gruppe auf.

Tab. 46: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl Mitosen pro 1000 Hepatozyten in extrafokalem Lebergewebe. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

	DEN+NaCl	DEN+(0,25 mg)CP	DEN+(0,5 mg)CP	DEN+(1 mg)CP
MW	1,39	0,59	1,64	1,88
SD	0,64	0,44	0,90	1,06
KI	0,60 – 2,18	0,04 – 1,14	0,52 – 2,76	0,57 – 3,20
n _L (n _S)	5 (5)	5 (5)	5 (5)	5 (5)
MW normiert	1,00	0,43	1,18	1,36
KI	0,43 – 1,57	0,03 – 0,82	0,38 – 1,98	0,41 – 2,30

DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n_L = Anzahl Lebern, n_S = Anzahl Leberschnitte, MW normiert = MW in DEN+CP-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Gruppe.

Tab. 47: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro 1000 Hepatozyten in extrafokalem Lebergewebe. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

	DEN+NaCl	DEN+ (0,25 mg)CP	DEN+ (0,5 mg)CP	DEN+ (1 mg)CP
MW	2,16	1,73	4,00	3,22
SD	0,74	0,59	3,12	1,89
KI	0,99 – 3,33	1,00 – 2,47	0,12 – 7,87	0,87 – 5,57
n _L (n _S)	4 (4)	5 (5)	5 (5)	5 (5)
MW normiert	1,00	0,80	1,85	1,49
KI	0,46 – 1,54	0,46 – 1,14	0,06 – 3,64	0,40 – 2,58

DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n_L = Anzahl Lebern, n_S = Anzahl Leberschnitte, MW normiert = MW in DEN+CP-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Gruppe.

Es schien keine Korrelation von Cisplatinindosis und Zellproliferation bzw. -verlust im extrafokalen Lebergewebe von DEN-behandelten Eiern zu bestehen.

4.4.4 Einfluss von Cisplatin auf FAH

In zwei Versuchen wurden in der DEN+NaCl-Gruppe Leberschnitte von insgesamt 68 Lebern auf fokale hepatozelluläre Veränderungen (FAH) untersucht und es wurden 176 FAH gefunden. In der DEN+(0,25)CP-, DEN+(0,5 mg)CP- und DEN+(1 mg)CP-Gruppe wurden Leberschnitte von 54, 52 bzw. 40 Lebern untersucht und 92, 58 bzw. 46 FAH beobachtet. Anhand morphometrischer Daten und der Analyse von Zellproliferation und -verlust (durch Zählen von Mitosefiguren und TUNEL-positiven Zellen) wurden diese miteinander verglichen.

4.4.4.1 Morphometrische Quantifizierung der FAH unter Einfluss von Cisplatin

Für die morphometrische Quantifizierung wurden die Anschnittflächen aller individuellen FAH und die ausgewertete Leberschnittfläche in beiden Versuchen (DC 1 und DC 2) gemessen.

Flächenanteil der FAH unter Einfluss von Cisplatin

Die Fläche, die FAH von der ausgewerteten Leberfläche eines Embryos ausmachte, war in beiden Versuchen in DEN+(0,5 mg)CP- und DEN+(1 mg)CP-Lebern geringer als in DEN+NaCl-Lebern. In Lebern mit geringer Cisplatindosis [DEN+(0,25 mg)CP] verringerte sich der Flächenanteil gegenüber DEN+NaCl-Lebern im Versuch DC 1 deutlich und im Versuch DC 2 zeigte sich keine Veränderung (Tab. 48 und Abb. 18 A). Im Versuch DC 1 waren alle Unterschiede der DEN+CP-Gruppen zur DEN+NaCl-Gruppe signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,01$).

Tab. 48: Einfluss von Cisplatin auf die Fläche der FAH [μm^2] in 1 mm^2 Lebergewebe in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2).

	Gr	MW	SD	KI	n_L (n_S)	MW normiert	KI
DC 1	1	819	227	29 – 1608	34 (157)	1,00	0,04 – 1,96
	2	266	521	35 – 497	23 (104)	0,32	0,04 – 0,61
	3	431	733	135 – 727	26 (117)	0,53	0,16 – 0,89
	4	129	235	-6 – 265	14 (59)	0,16	-0,01 – 0,32
DC 2	1	763	1687	174 – 1352	34 (169)	1,00	0,23 – 1,11
	2	866	1535	303 – 1429	31 (155)	1,13	0,40 – 1,87
	3	524	1927	-254 – 1302	26 (130)	0,69	-0,33 – 1,71
	4	408	706	123 – 693	26 (130)	0,54	0,16 – 0,91

Gr = Gruppe, 1 = DEN+NaCl-Gruppe, 2 = DEN+(0,25 mg)CP, 3 = DEN+(0,5 mg)CP, 4 = DEN+(1 mg)CP, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n_L = Anzahl Lebern, n_S = Anzahl Leberschnitte, MW normiert = MW in DEN+CP-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Gruppe.

Anzahl FAH-Anschnitte unter Einfluss von Cisplatin

Die Anzahl der FAH-Anschnitte pro ausgewerteter Leberfläche (cm²) eines Embryos war in beiden Versuchen in der DEN+NaCl-Gruppe am größten und verringerte sich in DEN+(0,5 mg)CP- und DEN+(1 mg)CP-Lebern. Die geringste Cisplatinosis hatte keinen eindeutigen Effekt auf die Anzahl der FAH-Anschnitte. Im ersten Versuch gab es in DEN+(0,25 mg)CP-Lebern eine deutliche Verringerung der Anzahl von FAH-Anschnitten mit einem signifikanten Unterschied zu DEN+NaCl-Lebern (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Im zweiten Versuch gab es in DEN+(0,25 mg)CP-Lebern keine Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Lebern (Tab. 49 und Abb. 18 B).

Tab. 49: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl der FAH-Anschnitte pro cm² Lebergewebe in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2).

	Gr	MW	SD	KI	n _L (n _S)	MW normiert	KI
DC 1	1	0,79	1,39	0,31 – 1,28	34 (157)	1,00	0,39 – 1,61
	2	0,19	0,32	0,05 – 0,33	23 (104)	0,24	0,06 – 0,42
	3	0,41	0,54	0,19 – 0,62	26 (117)	0,51	0,24 – 0,79
	4	0,26	0,41	0,02 – 0,49	14 (59)	0,32	0,03 – 0,62
DC 2	1	0,43	0,90	0,12 – 0,75	34 (169)	1,00	0,27 – 1,73
	2	0,43	0,60	0,21 – 0,66	31 (155)	1,00	0,49 – 1,51
	3	0,18	0,27	0,08 – 0,29	26 (130)	0,43	0,18 – 0,68
	4	0,23	0,29	0,12 – 0,35	26 (130)	0,54	0,27 – 0,81

Gr = Gruppe, 1 = DEN+NaCl-Gruppe, 2 = DEN+(0,25 mg)CP, 3 = DEN+(0,5 mg)CP, 4 = DEN+(1 mg)CP, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n_L = Anzahl Lebern, n_S = Anzahl Leberschnitte, MW normiert = MW in DEN+CP-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Gruppe.

Anschnittfläche der FAH unter Einfluss von Cisplatin

Die Größe der FAH-Anschnittfläche zeigte ein unterschiedliches Bild in beiden Versuchen (Tab. 50 und Abb. 18 C). Im ersten Versuch war die Anschnittfläche in DEN+NaCl-Lebern und DEN+(0,5 mg)CP-Lebern etwa gleich groß. Gegenüber der DEN+NaCl-Gruppe vergrößerte sich die FAH-Anschnittfläche in DEN+(0,25 mg)CP-Lebern und in DEN+(1 mg)CP-Lebern verringerte sie sich um etwa die Hälfte. Im zweiten Versuch zeigte sich für alle Dosisgruppen ein anderes Bild. Die Fläche der FAH-Anschnitte war in DEN+NaCl-, DEN+(0,25 mg)CP- und DEN+(1 mg)CP-Lebern etwa gleich groß. In der Gruppe mit mittlerer Cisplatinosis war die Anschnittfläche deutlich größer.

Tab. 50: Einfluss von Cisplatin auf die Anschnittfläche [mm^2] der FAH in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2).

	Gr	MW	SD	KI	n	MW normiert	KI
DC 1	1	0,10	0,13	0,08 – 0,13	83	1,00	0,74 – 1,26
	2	0,15	0,17	0,04 – 0,25	13	1,40 ^a	0,38 – 2,41
	3	0,11	0,18	0,05 – 0,18	30	1,08	0,44 – 1,72
	4	0,05	0,04	0,02 – 0,08	9	0,48	0,22 – 0,74
DC 2	1	0,18	0,29	0,12 – 0,24	93	1,00	0,77 – 1,23
	2	0,20	0,37	0,12 – 0,29	31	1,16	0,85 – 1,47
	3	0,29	0,71	0,02 – 0,57	28	1,68	0,98 – 2,37
	4	0,17	0,20	0,11 – 0,24	37	0,98	0,78 – 1,17

Gr = Gruppe, 1 = DEN+NaCl-Gruppe, 2 = DEN+(0,25 mg)CP, 3 = DEN+(0,5 mg)CP, 4 = DEN+(1 mg)CP, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n_L = Anzahl Lebern, n_S = Anzahl Leberschnitte, MW normiert = MW in DEN+CP-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Gruppe, a = genauere Werte dieser Berechnung: $0,14521071/0,10400304 = 1,39621602$.

Insgesamt zeigte sich, dass durch Cisplatin-Behandlung der Flächenanteil präneoplastischer FAH vermindert wurde. Der im ersten Versuch deutliche und zum Teil signifikante Effekt konnte im zweiten Versuch nicht vollständig reproduziert werden.

Auf die Anzahl von FAH-Anschnitten pro cm^2 und auf die Größe der FAH-Anschnittfläche hatte Cisplatin keinen eindeutigen Effekt.

Die Größe der Leberschnitte beider Versuche unterschied sich in jeder Versuchsgruppe signifikant voneinander. Im ersten Versuch waren sie kleiner als im zweiten Versuch [DEN+NaCl: 65,68 bzw. 122,10 mm²; DEN+(0,25 mg)CP: 63,90 bzw. 117,79 mm²; DEN+(0,5 mg)CP: 62,39 bzw. 114,08 mm²; DEN+(1 mg)CP: 57,94 bzw. 124,42 mm²; t-Test: je $p < 0,001$].

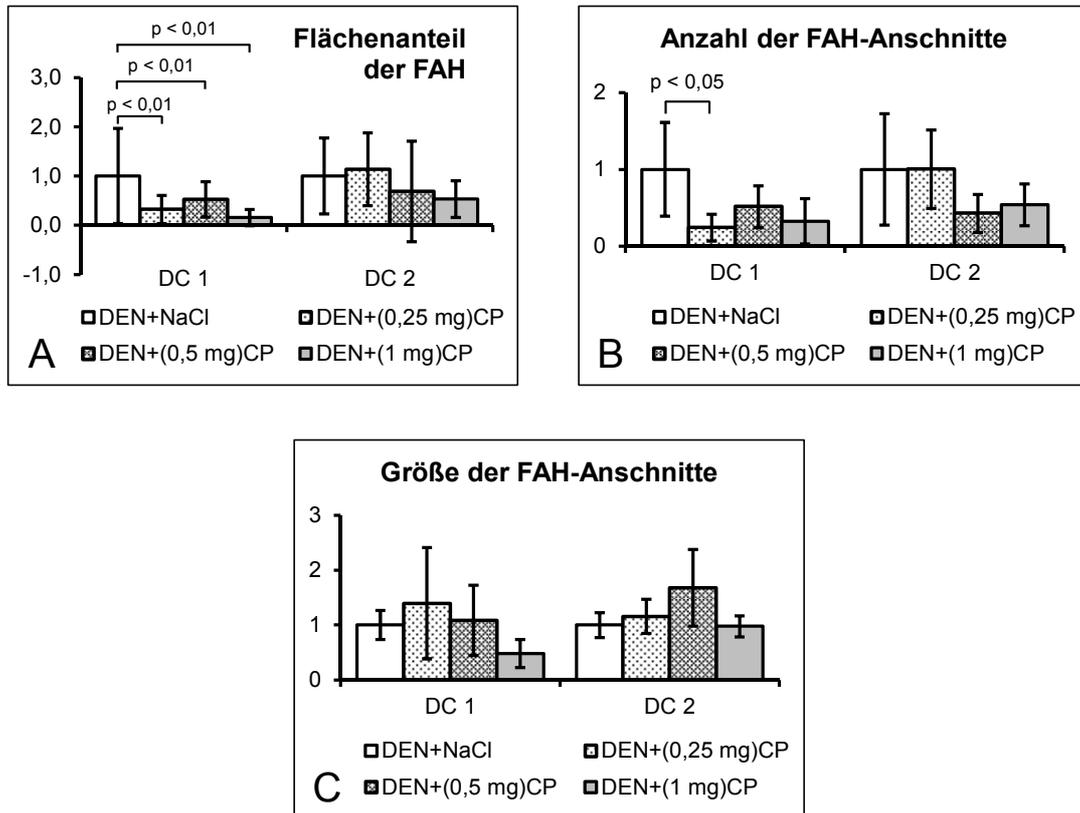


Abb. 18: Morphometrische Daten der FAH unter Einfluss von Cisplatin in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2). Darstellung von Mittelwert und oberer und unterer Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, normierte Werte, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

(A) Flächenanteil der FAH vom Lebergewebe, Mann-Whitney-U-Test.

(B) Anzahl der FAH-Anschnitte pro cm² Lebergewebe, Mann-Whitney-U-Test.

(C) Größe der FAH-Anschnitte [mm²].

4.4.4.2 Einfluss von Cisplatin auf Zellproliferation und -verlust in FAH

Für die folgende Berechnung wurden FAH des zweiten Versuches untersucht. Die Anzahl Mitosen und TUNEL-positiver Zellen in FAH waren in allen Versuchsgruppen größer als in extrafokalem Lebergewebe (siehe Tab. 46 und Tab. 47).

In der Gesamtheit der ausgewerteten FAH war die Mitoserate in FAH der DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP-Gruppe annähernd gleich. Mit steigender Cisplatinosis nahm

die Mitoserate zu. So war beispielsweise die Mitoserate in FAH von DEN+(1 mg)CP-Lebern 1,4 Mal höher als in FAH von DEN+NaCl-Lebern (Tab. 51 und Abb. 19 B). Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen wurde mit steigender Cisplatinosis größer. Sie war in DEN+(1 mg)CP-Lebern 1,6 Mal größer als in FAH in DEN+NaCl-Lebern (Tab. 52 und Abb. 19 B). Dieser Unterschied war signifikant (t-Test, $p < 0,05$).

Tab. 51: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl Mitosen pro 1000 Hepatozyten in FAH. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

	DEN+NaCl	DEN+ (0,25 mg)CP	DEN+ (0,5 mg)CP	DEN+ (1 mg)CP
MW	5,22	5,60	6,48	7,29
SD	4,47	5,07	5,68	6,34
KI	4,09 – 6,34	4,42 – 6,79	4,27 – 8,68	5,11 – 9,47
n	63	73	28	35
MW normiert	1,00	1,07	1,24	1,40
KI	0,78 – 1,22	0,85 – 1,30	0,82 – 1,66	0,98 – 1,82

DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl FAH, MW normiert = MW in DEN+CP-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Gruppe.

Tab. 52: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro 1000 Hepatozyten in FAH. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

	DEN+NaCl	DEN+ (0,25 mg)CP	DEN+ (0,5 mg)CP	DEN+ (1 mg)CP
MW	5,30	7,12	7,56	8,65
SD	5,71	7,40	8,13	8,48
KI	3,85 – 6,75	5,40 – 8,85	4,41 – 10,71	5,64 – 11,66
n	62	73	28	33
MW normiert	1,00	1,34	1,43	1,63
KI	0,73 – 1,27	1,02 – 1,67	0,83 – 2,02	1,06 – 2,20

DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl FAH, MW normiert = MW in DEN+CP-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Gruppe.

Mit steigender Cisplatinosis schienen sich sowohl Zellproliferation als auch Zellverlust innerhalb der FAH zu erhöhen.

4.4.4.3 Zusammenhang histologischer Parameter und Zellproliferation bzw. -verlust innerhalb der FAH unter Einfluss von Cisplatin

Für die FAH-Klassifikation wurden, wie im Kapitel 3.5.2 beschrieben, verschiedene Merkmale der FAH in Zahlen ausgedrückt beschrieben. Dazu zählen die tubuläre Struktur des FAH, die Pleomorphie, das Auftreten atypischer Nuklei und prominenter Nukleoli innerhalb des FAH und die Kompression des umliegenden Lebergewebes durch den FAH. Die durchschnittlichen Werte der beschriebenen Merkmale für FAH der DEN+NaCl und der jeweiligen DEN+CP-Gruppe sind in Tabelle (siehe Anhang) aufgelistet. Für die einzelnen Merkmale wurde überprüft, ob die Möglichkeit der Korrelation der Ausprägung des Merkmals mit der Höhe von Zellproliferation bzw. -verlust besteht, d. h. ob beispielsweise FAH mit verstärkter tubulärer Struktur mehr Mitosen haben als FAH mit geringer tubulärer Struktur. Die Methode der zu Grunde liegenden Berechnung findet sich in Kapitel 3.5.5.5. Die genauen Werte dazu sind in Tabelle 85 und Tabelle 86 (siehe Anhang) dargestellt. In Tabelle 53 findet sich eine vereinfachte Darstellung der Werte.

In DEN+NaCl-Lebern wiesen FAH mit verstärkter Pleomorphie mehr Mitosen auf. Das Vorhandensein tubulärer Strukturen, atypischer Nuklei und prominenter Nukleoli kam einher mit mehr Zellverlust. FAH, die das umliegende Gewebe komprimierten, hatten im Vergleich zu FAH, die das umliegende Gewebe nicht komprimierten weniger Mitosen und TUNEL-positive Zellen.

FAH in DEN+(0,25 mg)CP-Lebern, die eine vermehrte tubulärer Struktur aufwiesen, hatten höhere Werte für Zellproliferation und -verlust. Mehr Mitosen fanden sich auch in FAH mit vermehrt atypischen Nuklei und prominenten Nukleoli. Eine verminderte Anzahl TUNEL-positiver Zellen gab es in FAH mit pleomorphen Kernen und prominenten Nukleoli. Komprimierende FAH wiesen etwas mehr Mitosen und weniger TUNEL-positive Zellen auf als nicht komprimierende FAH.

In DEN+(0,5 mg)CP-Lebern hatten FAH, in denen jedes untersuchte Merkmal verstärkt vorkam, eine erhöhte Mitoseanzahl gegenüber FAH, in denen das Merkmal nicht bzw. nicht so sehr ausgeprägt war. Daneben wiesen FAH mit tubulären Strukturen deutlich mehr TUNEL-positive Zellen auf als FAH ohne tubuläre Strukturen. In FAH mit atypischen Nuklei, prominenten Nukleoli oder Kompression des umliegenden Gewebes gab es weniger TUNEL-positive Zellen als in FAH, die diese Merkmale nicht aufwiesen.

In der Gruppe der DEN+(1 mg)CP-Lebern wiesen pleomorphe FAH oder FAH mit prominenten Nukleoli weniger Mitosen auf als FAH ohne diese Merkmale. Zudem wiesen FAH mit prominenten Nukleoli einen deutlich höheren Zellverlust auf als FAH ohne prominente Nukleoli. FAH, die das umliegende Gewebe komprimierten hatten eine deutlich geringere Mitoserate und Zahl TUNEL-positiver Zellen als FAH, die das umliegende Gewebe nicht komprimierten.

Insgesamt hatte Cisplatin keinen einheitlichen Effekt auf den Zusammenhang zwischen histologischen Merkmalen und Zellproliferation bzw. -verlust. Wie auch bei den Untersuchungen des Sorafenib-Effektes gesehen, stand der Parameter „Kompression des umliegenden Lebergewebes“ in starker Korrelation zur Anzahl Mitosen bzw. TUNEL-positiver Zellen.

Tab. 53: Zusammenhang von histologischen Parametern und der Anzahl Mitosen bzw. TUNEL-positiver Hepatozyten in FAH in DEN+DMSO- und DEN+CP-Lebern; Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

	DEN+NaCl		DEN+ (0,25 mg)CP		DEN+ (0,5 mg)CP		DEN+ (1 mg)CP	
	M	T	M	T	M	T	M	T
tubuläre Struktur	k. Z.	++	+	+	+	+++	+	k. Z.
Pleomorphie	++	k. Z.	k. Z.	-	+	+	-	+
atypische Nuklei	k. Z.	+	+	k. Z.	++	-	k. Z.	k. Z.
prominente Nukleoli	k. Z.	++	+	--	++	---	-	+++
Kompression des umliegenden Gewebes	--	---	+	---	+	---	---	---

DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, M = Mitosen, T = TUNEL-positiv, k. Z. = kein Zusammenhang, „+“ bzw. „-“ = geringer Zusammenhang, „++“ = mittel starker Zusammenhang, „+++“ = starker Zusammenhang.

4.4.5 Einfluss von Cisplatin auf basophile und eosinophile FAH

Abhängig von der Klassifikation in den Parametern zytoplasmatische Basophilie und Eosinophilie wurden die FAH im zweiten Versuch (DC 2) wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben in basophile (BCF) und eosinophile (ECF) FAH eingeteilt. Im ersten Versuch (DC 1) wurden eosinophile und basophile FAH ohne Erhebung dieser umfangreichen Parameter direkt am Mikroskop gruppiert. Morphometrische

Untersuchungen wurden für beide Versuche durchgeführt. Zellproliferation und -verlust wurden durch Zählen von Mitosefiguren und TUNEL-positiven Zellen der FAH im zweiten Versuch ermittelt.

4.4.5.1 Verteilung von BCF und ECF unter Einfluss von Cisplatin

Im ersten Versuch kamen in DEN+NaCl-, DEN+(0,5 mg)CP- und DEN+(1 mg)CP-Lebern deutlich mehr basophile als eosinophile FAH vor (Tab. 54). In der DEN+(0,25 mg)CP-Gruppe gab es etwa gleich viele basophile und eosinophile FAH. Im zweiten Versuch überwogen basophile FAH in allen Gruppen.

Gegenüber NaCl wurde der prozentuale Anteil basophiler FAH unter dem Einfluss von 0,5 mg und 1 mg Cisplatin gesteigert, d. h. eosinophile FAH wurden seltener beobachtet.

Tab. 54: Einfluss von Cisplatin auf die Verteilung von basophilen und eosinophilen FAH. Daten ermittelt aus zwei Versuchen (DC 1 und DC 2); Angabe von prozentuaalem Anteil und Anzahl der FAH.

Versuch	FAH-Typ	DEN+NaCl	DEN+(0,25 mg)CP	DEN+(0,5 mg)CP	DEN+(1 mg)CP
DC 1	BCF	84 % (70)	54 % (7)	100 % (30)	100 % (9)
	ECF	16 % (13)	46 % (6)	0 % (0)	0 % (0)
DC 2	BCF	76 % (71)	77 % (61)	81 % (23)	84 % (31)
	ECF	24 % (22)	23 % (18)	19 % (5)	16 % (6)

DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, BCF = basophile fokale hepatozelluläre Veränderung, ECF = eosinophile fokale hepatozelluläre Veränderung.

4.4.5.2 Morphometrische Quantifizierung von BCF und ECF unter Einfluss von Cisplatin

Flächenanteil von BCF und ECF unter Einfluss von Cisplatin

In allen Versuchsgruppen überwog die Fläche, die basophile FAH (BCF, Tab. 55) von der ausgewerteten Leberfläche einnahm, deutlich der von eosinophilen FAH (ECF, Tab. 56). In DEN+NaCl-Lebern waren die Unterschiede in beiden Versuchen signifikant (Mann-Whitney-U-Test, DC 1: $p < 0,001$, DC 2: $p < 0,01$). In DEN+(0,25 mg)CP- und DEN+(1 mg)CP-Lebern waren sie im Versuch DC 2 signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$).

Der Flächenanteil von BCF wurde durch Cisplatin verringert. Im ersten Versuch war dieser Effekt bei 0,25 und 1 mg Cisplatin ähnlich deutlich. Die Dosis von 0,5 mg Cisplatin hatte einen geringeren Effekt. Beim Vergleich zwischen DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP-Lebern war der Unterschied signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Im zweiten Versuch war der Flächenanteil basophiler FAH in DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP-Lebern etwa gleich. Verglichen dazu war der Flächenanteil in DEN+(0,5 mg)CP- und DEN+(1 mg)CP-Lebern etwa um die Hälfte reduziert.

Eosinophile FAH waren unter Einfluss von 0,5 und 1 mg Cisplatin im ersten Versuch nicht zu finden. In DEN+(0,25 mg)-Lebern halbierte sich der Flächenanteil von ECF gegenüber dem in DEN+NaCl-Lebern. Im zweiten Versuch zeigte sich für ECF nahezu der gleiche Cisplatin-Effekt wie für BCF: im Vergleich zu DEN+NaCl-Lebern wurde nach Behandlung mit 0,5 und 1 mg Cisplatin eine Verminderung eosinophiler FAH beobachtet, nicht jedoch nach Behandlung mit 0,25 mg Cisplatin.

Tab. 55: Einfluss von Cisplatin auf die Fläche basophiler FAH [μm^2] in 1 mm^2 Lebergewebe in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DC 1	DEN+NaCl	34	640	1512	112 – 1167
	DEN+(0,25 mg)CP	23	173	496	-41 – 388
	DEN+(0,5 mg)CP	26	431	733	135 – 727
	DEN+(1 mg)CP	14	129	235	-6 – 265
DC 2	DEN+NaCl	34	683	1537	147 – 1219
	DEN+(0,25 mg)CP	31	768	1510	214 – 1322
	DEN+(0,5 mg)CP	26	488	1931	-292 – 1268
	DEN+(1 mg)CP	26	359	663	91 – 627

n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

Tab. 56: Einfluss von Cisplatin auf die Fläche eosinophiler FAH [μm^2] in 1 mm^2 Lebergewebe in zwei Versuchen.

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DC 1	DEN+NaCl	34	177	856	-122 – 476
	DEN+(0,25 mg)CP	23	93	243	-12 – 198
	DEN+(0,5 mg)CP	26	0	–	–
	DEN+(1 mg)CP	14	0	–	–
DC 2	DEN+NaCl	34	98	283	-1 – 196
	DEN+(0,25 mg)CP	31	97	197	25 – 170
	DEN+(0,5 mg)CP	26	36	80	4 – 68
	DEN+(1 mg)CP	26	49	124	-1 – 99

n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

Anzahl der FAH-Anschnitte von BCF und ECF pro cm^2 Lebergewebe unter Einfluss von Cisplatin

In allen Versuchsgruppen wurden mehr basophile als eosinophile FAH pro cm^2 Lebergewebe angeschnitten. Im ersten Versuch war der Unterschied in der DEN+NaCl-Gruppe signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,001$). Im zweiten Versuch gab es auch der signifikante Unterschied– in der DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP-Gruppe $p < 0,05$ und in der DEN+(1 mg)CP-Gruppe $p < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test).

Die Anzahl der Anschnitte basophiler FAH (Tab. 57) wurde im ersten Versuch durch Cisplatin verringert. Dies war am deutlichsten in DEN+(0,25 mg)CP- und DEN+(1 mg)CP-Lebern. Der Unterschied durch den Einfluss von 0,25 mg Cisplatin war signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Die Anzahl Anschnitte eosinophiler FAH (Tab. 58) war in DEN+(0,25 mg)CP-Lebern gegenüber DEN+NaCl-Lebern kleiner.

Die Anzahl der Anschnitte basophiler FAH (Tab. 57) war im zweiten Versuch in DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP-Lebern gleich groß. Dem gegenüber verringerte sich die Anzahl unter Einfluss von 0,5 und 1 mg Cisplatin um 55 % bzw. 42 %. Auch die Anzahl der Anschnitte eosinophiler FAH (Tab. 58) war in DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP-Lebern gleich und reduzierte sich unter Einfluss von 0,5 und 1 mg Cisplatin um 70 % bzw. 60 %.

Tab. 57: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl der Anschnitte basophiler FAH pro cm² Lebergewebe in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DC 1	DEN+NaCl	34	0,68	1,09	0,30 – 1,06
	DEN+(0,25 mg)CP	23	0,11	0,29	-0,01 – 0,24
	DEN+(0,5 mg)CP	26	0,41	0,54	0,19 – 0,62
	DEN+(1 mg)CP	14	0,26	0,41	0,02 – 0,49
DC 2	DEN+NaCl	34	0,33	0,64	0,11 – 0,55
	DEN+(0,25 mg)CP	31	0,33	0,50	0,15 – 0,51
	DEN+(0,5 mg)CP	26	0,15	0,25	0,05 – 0,25
	DEN+(1 mg)CP	26	0,19	0,27	0,08 – 0,30

n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

Tab. 58: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl der Anschnitte eosinophiler FAH pro cm² Lebergewebe in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DC 1	DEN+NaCl	34	0,12	0,44	-0,03 – 0,28
	DEN+(0,25 mg)CP	23	0,08	0,18	-0,004 – 0,16
	DEN+(0,5 mg)CP	26	–	–	–
	DEN+(1 mg)CP	14	–	–	–
DC 2	DEN+NaCl	34	0,10	0,29	-0,002 – 0,20
	DEN+(0,25 mg)CP	31	0,10	0,18	0,04 – 0,17
	DEN+(0,5 mg)CP	26	0,03	0,07	0,004 – 0,06
	DEN+(1 mg)CP	26	0,04	0,12	-0,01 – 0,09

n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

Anschnittfläche von BCF und ECF unter Einfluss von Cisplatin

Die Anschnittfläche basophiler FAH (Tab. 59) im ersten Versuch war in der DEN+NaCl- und DEN+(0,5 mg)CP-Gruppe gleich groß. Gegenüber NaCl vergrößerte sich die Anschnittfläche in der DEN+(0,25 mg)CP-Gruppe und verringerte sich in der DEN+(1 mg)CP-Gruppe. Die Unterschiede waren nicht signifikant. Die Anschnittfläche eosinophiler FAH (Tab. 60) waren in der DEN+NaCl- und der DEN+(0,25 mg)CP-Gruppe etwa gleich groß. Innerhalb der DEN+NaCl-Gruppe war die Anschnittfläche von ECF gegenüber der von BCF größer.

Die Ergebnisse des zweiten Versuches waren abweichend von den Ergebnissen des ersten Versuches. Die Anschnittfläche basophiler FAH (Tab. 59) der DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP- und der DEN+(1 mg)CP-Gruppe waren etwa gleich groß. Im Vergleich dazu vergrößerte sich die Anschnittfläche bei der Dosis von 0,5 mg Cisplatin. Die Unterschiede waren nicht signifikant. Die Anschnittfläche von eosinophiler FAH (Tab. 60) wurde durch Cisplatin gegenüber der Kontrolle (NaCl) nicht verändert.

Die Anschnittfläche basophiler FAH war in allen Versuchsgruppen größer als die von eosinophilen FAH. In der DEN+NaCl-Gruppe war der Unterschied signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$).

Tab. 59: Einfluss von Cisplatin auf die Anschnittfläche [mm^2] der basophilen FAH in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2).

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DC 1	DEN+NaCl	70	0,10	0,12	0,07 – 0,12
	DEN+(0,25 mg)CP	7	0,16	0,23	-0,05 – 0,37
	DEN+(0,5 mg)CP	30	0,11	0,18	0,05 – 0,18
	DEN+(1 mg)CP	9	0,05	0,04	0,02 – 0,08
DC 2	DEN+NaCl	71	0,21	0,32	0,13 – 0,28
	DEN+(0,25 mg)CP	61	0,24	0,41	0,13 – 0,34
	DEN+(0,5 mg)CP	23	0,34	0,78	-0,004 – 0,67
	DEN+(1 mg)CP	31	0,18	0,21	0,10 – 0,26

n = Anzahl FAH, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

Tab. 60: Einfluss von Cisplatin auf die Anschnittfläche [mm²] der eosinophilen FAH in zwei Versuchen (DC 1 und DC 2)

Versuch	Gruppe	n	MW	SD	KI
DC 1	DEN+NaCl	13	0,15	0,17	0,04 – 0,25
	DEN+(0,25 mg)CP	6	0,13	0,10	0,02 – 0,23
	DEN+(0,5 mg)CP	0	–	–	–
	DEN+(1 mg)CP	0	–	–	–
DC 2	DEN+NaCl	22	0,08	0,09	0,04 – 0,12
	DEN+(0,25 mg)CP	18	0,08	0,09	0,04 – 0,15
	DEN+(0,5 mg)CP	5	0,11	0,03	0,07 – 0,14
	DEN+(1 mg)CP	6	0,12	0,10	0,02 – 0,23

n = Anzahl FAH, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

Insgesamt verringerte sich der Flächenanteil basophiler FAH in beiden Versuchen bei der Dosis von 1 mg Cisplatin deutlich. Unter Einfluss von 0,5 und 1 mg Cisplatin wurden im ersten Versuch keine eosinophilen FAH beobachtet und im zweiten Versuch war der Flächenanteil im Vergleich zu NaCl-Behandlung halbiert. Die Anzahl angeschnittener basophiler FAH verringerte sich nach 0,5 und 1 mg Cisplatin in beiden Versuchen. Auch die Zahl der Anschnitte eosinophiler FAH war nach Einfluss von 0,5 und 1 mg Cisplatin gegenüber NaCl vermindert (zweiter Versuch) oder es wurden keine eosinophilen FAH angeschnitten (erster Versuch).

Die beiden Versuche zeigten ein uneinheitliches Bild der Größe der Anschnittfläche basophiler FAH in den jeweiligen Versuchsgruppen. Die Anschnittfläche eosinophiler FAH wurde durch Cisplatin nicht beeinflusst.

4.4.5.3 Zellproliferation und -verlust in BCF und ECF unter Einfluss von Cisplatin

Cisplatin zeigte in basophilen und eosinophilen FAH einen unterschiedlichen Einfluss auf die Zellproliferation und -verlust. Beides erhöhte sich in basophilen FAH mit steigender Cisplatinosis (Tab. 61 und Abb. 19 C). In DEN+(1 mg)CP-Lebern war die Mitoserate basophiler FAH signifikant höher als in DEN+NaCl-Lebern (t-Test, $p < 0,05$).

In eosinophilen FAH schien sich die Mitoserate unter Cisplatineinfluss zu verringern. Die Zahl TUNEL-positiver Zellen war in eosinophilen FAH der DEN+NaCl- und DEN+(0,5 mg)CP-Gruppe nahezu gleich groß. Gegenüber der DEN+NaCl-Gruppe war sie in der DEN+(0,25 mg)CP-Gruppe doppelt so hoch und in der DEN+(1 mg)CP-Gruppe dreifach größer (Tab. 66 und Abb. 19 D). Etwaige Unterschiede waren nicht signifikant.

Tab. 61: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in basophilen FAH. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

	Gr	MW	SD	KI	n	MW normiert	KI
M	1	5,11	4,39	3,80 – 6,41	46	1,00	0,74 – 1,26
	2	6,41	5,18	5,01 – 7,81	55	1,26	0,98 – 1,53
	3	7,16	5,94	4,59 – 9,73	23	1,40	0,90 – 1,91
	4	8,42	6,36	6,00 – 10,84	29	1,65	1,18 – 2,12
T	1	6,11	6,24	4,23 – 7,98	45	1,00	0,66 – 1,34
	2	7,61	7,88	5,48 – 9,74	55	1,26	0,91 – 1,61
	3	8,74	8,69	4,98 – 12,50	23	1,44	0,82 – 2,07
	4	8,58	8,75	5,26 – 11,91	29	1,42	0,87 – 1,97

Gr = Gruppe, 1 = DEN+NaCl-Gruppe, 2 = DEN+(0,25 mg)CP, 3 = DEN+(0,5 mg)CP, 4 = DEN+(1 mg)CP, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl FAH, MW normiert = MW in DEN+CP-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Gruppe, M = Mitosen, T = TUNEL-positiv.

Tab. 62: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in eosinophilen FAH. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

	Gr	MW	SD	KI	n	MW norm	KI
M	1	5,52	4,81	3,04 – 7,99	17	1,00	0,55 – 1,45
	2	3,13	3,92	1,18 – 5,08	18	0,57	0,21 – 0,92
	3	4,40	4,19	-0,80 – 9,61	5	0,86	-0,16 – 1,88
	4	1,84	2,03	-0,28 – 3,97	6	0,36	-0,06 – 0,78
T	1	3,16	3,27	1,48 – 4,84	17	1,00	0,47 – 1,53
	2	5,63	5,61	2,84 – 8,42	18	1,79	0,90 – 2,67
	3	3,61	3,56	-0,82 – 8,03	5	1,14	-0,26 – 2,55
	4	10,35	8,28	1,65 – 19,04	6	3,28	0,52 – 6,04

Gr = Gruppe, 1 = DEN+NaCl-Gruppe, 2 = DEN+(0,25 mg)CP, 3 = DEN+(0,5 mg)CP, 4 = DEN+(1 mg)CP, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl FAH, MW normiert = MW in DEN+CP-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Gruppe, M = Mitosen, T = TUNEL-positiv.

4.4.6 Einfluss von Cisplatin auf nicht komprimierende und komprimierende FAH

Abhängig von der Klassifikation, ob der FAH das umliegende Lebergewebe komprimiert, wurden die FAH, wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben, in das umliegende Gewebe komprimierend [Foci of altered hepatocytes, komprimierend, FAH(k)] und das umliegende Gewebe nicht komprimierend [Foci of altered hepatocytes, nicht komprimierend, FAH(nk)] eingeteilt. Hierfür wurden FAH des zweiten Versuches (DC 2) klassifiziert, morphometrisch quantifiziert und es wurden Analysen von Zellproliferation und –verlust durch Zählen von Mitosefiguren und TUNEL-positiven Zellen durchgeführt.

In allen untersuchten Gruppen kamen hauptsächlich FAH vor, die das umliegende Lebergewebe nicht komprimierten. Der prozentuale Anteil komprimierender bzw. nicht komprimierender FAH war unabhängig von der Cisplatinosis (Tab. 63).

Tab. 63: Einfluss von Cisplatin auf die Verteilung von nicht komprimierenden [FAH(nk)] und komprimierenden [FAH(k)] FAH im Versuch DC 2; Angabe von prozentuaalem Anteil und Anzahl der FAH.

FAH-Typ	DEN+NaCl	DEN+ (0,25 mg)CP	DEN+ (0,5 mg)CP	DEN+ (1 mg)CP
FAH(nk)	87 % (81)	94 % (74)	89 % (25)	87 % (32)
FAH(k)	13 % (12)	6 % (5)	11 % (3)	13 % (5)

FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

4.4.6.1 Morphometrie von FAH(nk) und FAH(k) unter Einfluss von Cisplatin

Flächenanteil von FAH(nk) und FAH(k) unter Einfluss von Cisplatin

Der Anteil der nicht komprimierender FAH war in DEN+(0,5 mg)CP- und DEN+(1 mg)CP-Lebern gegenüber dem in DEN+NaCl-Lebern deutlich vermindert. Die Dosis von 0,25 mg Cisplatin hatte keinen Einfluss.

Der Anteil der komprimierenden FAH wurde durch 1 mg Cisplatin verringert. Die anderen Dosisgruppen beeinflussten den Anteil komprimierender FAH nicht.

Alle Werte sind in Tabelle 64 aufgeführt. Etwaige Unterschiede waren nicht signifikant.

Tab. 64: Einfluss von Cisplatin auf die Fläche von nicht komprimierenden und komprimierenden FAH [μm^2] in 1 mm^2 Lebergewebe. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

FAH-Typ	Gruppe	n	MW	SD	KI
FAH(nk)	DEN+NaCl	34	489	1155	85 – 891
	DEN+(0,25 mg)CP	31	597	864	280 – 914
	DEN+(0,5 mg)CP	26	281	755	-24 – 586
	DEN+(1 mg)CP	26	247	404	84 – 410
FAH(k)	DEN+NaCl	34	292	791	16 – 568
	DEN+(0,25 mg)CP	31	268	1228	-182 – 719
	DEN+(0,5 mg)CP	26	243	1193	-239 – 725
	DEN+(1 mg)CP	26	162	576	-71 – 394

FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls.

Anzahl der FAH-Anschnitte von FAH(nk) und FAH(k) pro cm² Lebergewebe unter Einfluss von Cisplatin

Die Anzahl angeschnittener nicht komprimierender FAH war in DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP-Lebern etwa gleich groß und verringerte sich unter Einfluss von 0,5 und 1 mg Cisplatin. Die Anzahl angeschnittener komprimierender FAH schien sich unter Einfluss von Cisplatin zu verringern. Alle Werte sind in Tabelle 65 aufgeführt. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Tab. 65: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl der Anschnitte von nicht komprimierenden und komprimierenden FAH pro cm² Lebergewebe. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

FAH-Typ	Gruppe	n	MW	SD	KI
FAH(nk)	DEN+NaCl	34	0,37	0,79	0,10 – 0,65
	DEN+(0,25 mg)CP	31	0,41	0,59	0,19 – 0,62
	DEN+(0,5 mg)CP	26	0,17	0,24	0,07 – 0,26
	DEN+(1 mg)CP	26	0,20	0,28	0,08 – 0,31
FAH(k)	DEN+NaCl	34	0,06	0,13	0,01 – 0,11
	DEN+(0,25 mg)CP	31	0,03	0,09	-0,004 – 0,06
	DEN+(0,5 mg)CP	26	0,02	0,07	-0,02 – 0,07
	DEN+(1 mg)CP	26	0,04	0,13	-0,02 – 0,09

FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, n = Anzahl Lebern, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls.

Anschnittfläche von FAH(nk) und FAH(k) unter Einfluss von Cisplatin

Nicht komprimierende FAH wiesen in allen Versuchsgruppen nahezu die gleiche Anschnittfläche auf. Komprimierende FAH hatten in DEN+NaCl- und DEN+(1 mg)CP-Lebern gleich große Anschnittflächen. Unter 0,25 und 0,5 mg Cisplatin war diese um das Doppelte größer, jedoch verglichen mit NaCl nicht signifikant unterschiedlich. Alle Werte sind in Tabelle 66 aufgelistet.

Tab. 66: Einfluss von Cisplatin auf die Anschnittfläche [mm²] von nicht komprimierenden und komprimierenden FAH. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

FAH-Typ	Gruppe	n	MW	SD	KI
FAH(nk)	DEN+NaCl	81	0,13	0,21	0,08 – 0,18
	DEN+(0,25 mg)CP	74	0,15	0,17	0,11 – 0,18
	DEN+(0,5 mg)CP	25	0,18	0,38	0,02 – 0,34
	DEN+(1 mg)CP	32	0,13	0,14	0,08 – 0,18
FAH(k)	DEN+NaCl	12	0,48	0,49	0,16 – 0,79
	DEN+(0,25 mg)CP	5	1,07	1,07	-0,26 – 2,40
	DEN+(0,5 mg)CP	3	1,27	1,87	-3,37 – 5,92
	DEN+(1 mg)CP	5	0,43	0,31	0,04 – 0,82

FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, n = Anzahl FAH, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls.

Insgesamt war der Anteil nicht komprimierender FAH größer als der von komprimierenden FAH. Unter Einfluss von 0,5 mg Cisplatin wurde der Anteil nicht komprimierender FAH gegenüber der Kontrolle (NaCl) vermindert. Die Dosis von 1 mg Cisplatin verringerte den Anteil von nicht komprimierenden und komprimierenden FAH.

Unter Einfluss von 0,5 mg und 1 mg Cisplatin verringerte sich die Anzahl der Anschnitte nicht komprimierender FAH deutlich gegenüber NaCl. Die Anzahl Anschnitte komprimierender FAH schien in allen Cisplatinosisgruppen geringer als in der Kontrolle (NaCl) zu sein.

Die Anschnittfläche nicht komprimierender FAH war in allen Versuchsgruppen gleich. Für komprimierende FAH vergrößerte sich die Anschnittfläche nach Einfluss von 0,25 und 0,5 mg Cisplatin.

4.4.6.2 Zellproliferation und -verlust von FAH(nk) und FAH(k) unter Einfluss von Cisplatin

Cisplatin zeigte auf Zellproliferation und -verlust in nicht komprimierenden und komprimierenden FAH einen unterschiedlichen Einfluss. In nicht komprimierenden FAH war die Mitoserate in DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP- und DEN+(0,5 mg)CP-Lebern gleich groß. Unter Einfluss von 1 mg Cisplatin schien sie größer zu sein. Die Zahl TUNEL-positiver Zellen erhöhte sich mit steigender Cisplatindosis gegenüber DEN+NaCl-Lebern (Tab. 67 und Abb. 19 E)

In komprimierenden FAH war die Mitoserate in DEN+NaCl- und DEN+(1 mg)CP-Lebern gleich groß und in den anderen beiden Versuchsgruppen etwa um das Doppelte höher. Die Zahl TUNEL-positiver Zellen erhöhte sich ebenfalls unter Cisplatineinfluss, jedoch nicht abhängig von der Cisplatindosis (Tab. 68 und Abb. 19 F). Keiner der etwaigen Unterschiede war signifikant.

Tab. 67: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in nicht komprimierenden FAH. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

	Gr	MW	SD	KI	n	MW normiert	KI
M	1	5,61	4,70	4,28 – 6,93	51	1,00	0,76 – 1,24
	2	5,49	4,97	4,29 – 6,69	68	0,98	0,76 – 1,19
	3	6,31	5,86	3,89 – 8,73	25	1,13	0,69 – 1,56
	4	7,94	6,57	5,48 – 10,39	30	1,42	0,98 – 1,85
T	1	6,08	6,09	4,34 – 7,81	50	1,00	0,71 – 1,29
	2	7,34	7,54	5,52 – 9,17	68	1,21	0,91 – 1,51
	3	8,06	8,44	4,57 – 11,54	25	1,33	0,75 – 1,90
	4	9,41	8,97	5,39 – 12,89	28	1,55	0,98 – 2,12

Gr = Gruppe, 1 = DEN+NaCl-Gruppe, 2 = DEN+(0,25 mg)CP, 3 = DEN+(0,5 mg)CP, 4 = DEN+(1 mg)CP, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n_L = Anzahl Lebern, n_S = Anzahl Leberschnitte, MW normiert = MW in DEN+CP-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Gruppe, M = Mitosen, T = TUNEL-positiv.

Tab. 68: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in komprimierenden FAH. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

	Gr	MW	SD	KI	n	MW normiert	KI
M	1	3,55	2,91	1,70 – 5,40	12	1,00	0,48 – 1,52
	2	7,11	6,82	-1,36 – 15,58	5	2,00	-0,38 – 4,38
	3	7,65	4,58	-3,72 – 19,02	3	2,15	-1,05 – 5,35
	4	3,43	2,74	0,03 – 6,83	5	0,96	0,01 – 1,92
T	1	2,07	1,25	1,28 – 2,86	12	1,00	0,62 – 1,38
	2	4,09	4,61	-1,64 – 9,81	5	1,97	-0,79 – 4,74
	3	3,15	2,36	-2,70 – 9,01	3	1,52	-1,30 – 4,35
	4	4,41	2,43	1,40 – 7,43	5	2,13	0,68 – 3,59

Gr = Gruppe, 1 = DEN+NaCl-Gruppe, 2 = DEN+(0,25 mg)CP, 3 = DEN+(0,5 mg)CP, 4 = DEN+(1 mg)CP, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n_L = Anzahl Lebern, n_S = Anzahl Leberschnitte, MW normiert = MW in DEN+CP-Gruppe als Veränderung gegenüber DEN+NaCl-Gruppe, M = Mitosen, T = TUNEL-positiv.

4.4.7 Nettowachstum unter Cisplatin-Einfluss

Für die Errechnung des Nettowachstums wurden die Angaben von Zellproliferation und -verlust in Beziehung gesetzt. Tabelle 69 zeigt das Nettowachstum der verschiedenen Veränderungen unter Behandlung mit verschiedenen Cisplatin-Dosen. In allen Versuchsgruppen hatten FAH gegenüber dem extrafokalen Lebergewebe einen Wachstumsvorteil. Speziell in der DEN+(1 mg)CP-Gruppe war das Nettowachstum der basophiler FAH höher als das eosinophiler FAH. Eine erweiterte Tabelle mit den jeweiligen Standardabweichungen und Anzahlen der Proben findet sich in Tabelle 87 (siehe Anhang).

Tab. 69: Einfluss von Cisplatin auf das Nettowachstum (Zellen pro 24 h) des extrafokalen Lebergewebes, FAH, basophiler (BCF) und eosinophiler FAH, nicht komprimierender und komprimierender FAH des Versuches DC 2; Angabe des Mittelwertes.

	EF	FAH	BCF	ECF	FAH(nk)	FAH(k)
DEN+NaCl	26,76	125,55	112,01	151,56	132,35	97,22
DEN+(0,25 mg)CP	7,62	122,27	144,28	55,04	116,94	194,79
DEN+(0,5 mg)CP	20,47	146,73	159,11	112,08	137,55	219,61
DEN+(1 mg)CP	34,51	173,58	217,44	-23,76	191,29	74,41

EF = extrafokales Lebergewebe, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, BCF = basophiler FAH, ECF = eosinophiler FAH, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

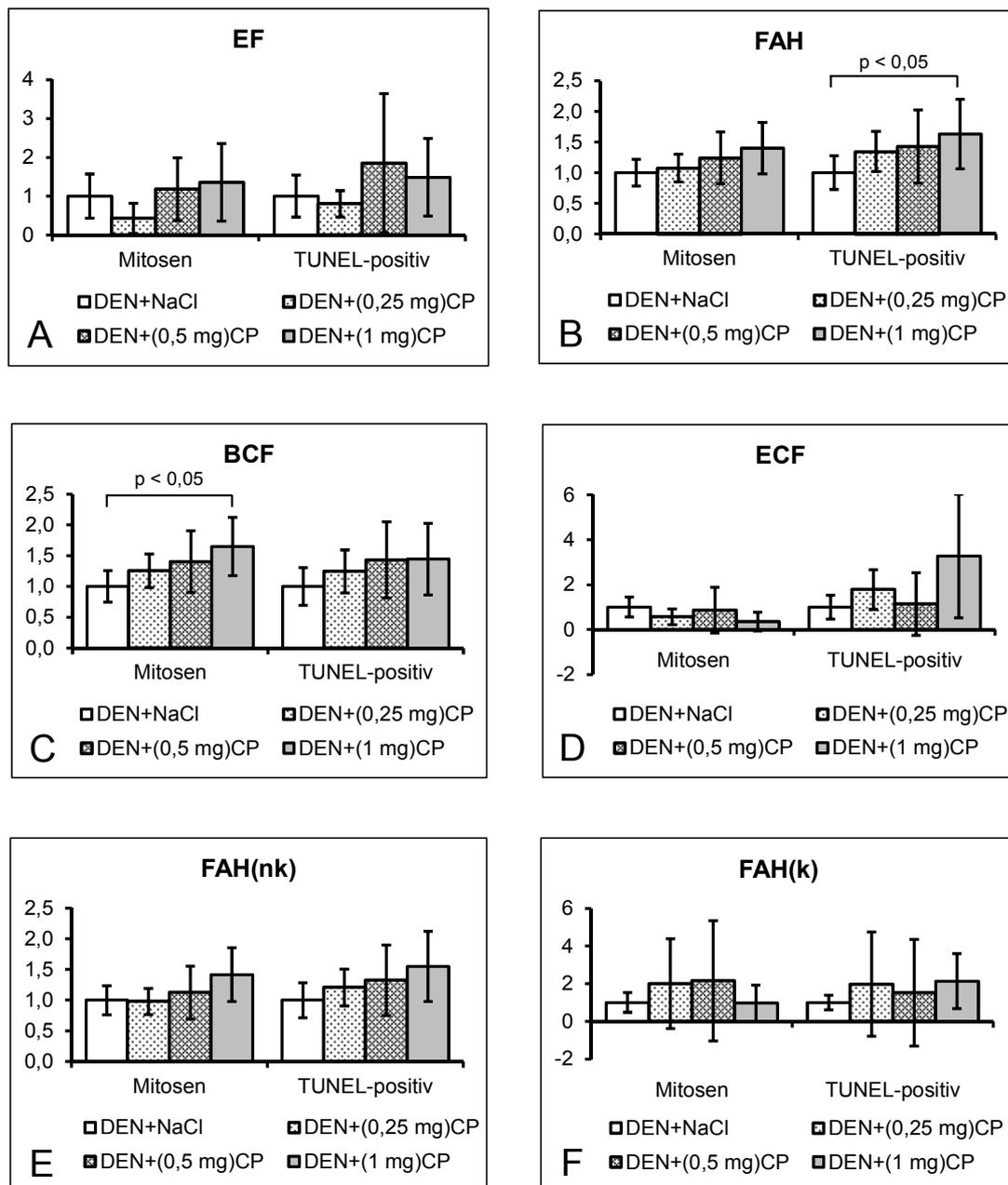


Abb. 19: Einfluss von Cisplatin auf die Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in extrafokalem Gewebe und FAH, Darstellung von Mittelwert und oberer und unterer Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, normierte Werte, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin.

(A) Extrafokales Lebergewebe

(B) Fokale hepatozelluläre Veränderungen, Mann-Whitney-U-Test.

(C) Basophile fokale hepatozelluläre Veränderungen, t-Test.

(D) Eosinophile fokale hepatozelluläre Veränderungen.

(E) Nicht komprimierende fokale hepatozelluläre Veränderungen.

(F) Komprimierende fokale hepatozelluläre Veränderungen.

5 Diskussion

5.1 Auswahl der Methoden

5.1.1 Induktion fokaler hepatozellulärer Veränderungen mit Diethylnitrosamin

Das Karzinogen Diethylnitrosamin (DEN) induziert in embryonaler Putenleber verlässlich Tumorstufen [20, 27]. Diese werden als „foci of altered hepatocytes“ (FAH, fokale hepatozelluläre Veränderungen) bezeichnet. Die Untersuchung des Effektes verschiedener Tumorthapeutika in Bezug auf FAH und extrafokales Gewebe in embryonaler Putenleber war Ziel der vorliegenden Arbeit. Die hierfür geeignete DEN-Dosis wurde unter Einbezug des Einflusses auf die Überlebensrate der Putenembryonen und die Leberbeschaffenheit gewählt.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Wasser) verringerte sich die Überlebensrate der Putenembryonen in der 6 mg DEN- und 8 mg DEN-Gruppe deutlich, während 2 mg DEN keinen Einfluss auf die Überlebensrate hatte. Dieses Verhältnis ist im Einklang mit der Arbeit von Williams et al. [75]. Weiterhin führte die Dosis von 6 bzw. 8 mg DEN pro Ei im Vergleich zur Kontrollgruppe zu vermindertem Embryo- und Lebergewicht. Auch bei Dosen von 4 bzw. 5 mg DEN pro Ei wurde ein im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrigeres Embryogewicht beschrieben [20, 75]. Die fraktionierte Gabe von 4 mg DEN in Einzeldosen von je 2 mg DEN verringerte ebenso die Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Es ist bekannt, dass mit steigender DEN-Dosis mehr FAH induziert werden [20, 27, 76, 77]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden in der höchsten DEN-Dosisgruppe die meisten FAH induziert. Daneben veränderte sich das extrafokale Gewebe ebenfalls mit steigender DEN-Dosis. Beispielsweise traten vermehrt Hepatozyten mit vergrößertem Zellkern (Megalozyten) und pseudoglanduläre Strukturen auf. Dies stimmt ebenfalls mit Ergebnissen einer vorhergehenden Arbeit überein [75].

Für die spätere Applikation des Tumorthapeutikums Cisplatin war die Verlagerung der Chorio-Allantois-Membran nötig. In allen Dosisgruppen verringerte diese die Überlebensrate. Dies ist ebenfalls für die Auswahl der DEN-Dosis zu beachten.

Für die Induktion der FAH wurde die Dosis von 2 mg DEN pro Ei gewählt. Es wurden verlässlich FAH induziert, ohne zu exzessiver Mortalität oder starker Veränderung des extrafokalen Lebergewebes zu führen.

5.1.2 Induktion fokaler hepatozellärer Veränderungen mit Diethylnitrosamin und Promotoren

Aus zahlreichen Versuchen an Nagern ist Phenobarbital als Promotor der Hepatokarzinogenese bekannt. Phenobarbital erhöht die Anzahl FAH und führt auch zu weiter fortgeschrittenen Läsionen [23, 78]. Das ebenso in der vorliegenden Arbeit untersuchte 3-Methylcholanthren kann je nach Versuchsbedingungen die Anzahl von FAH in Ratten erhöhen [79], verringern [80] oder unbeeinflusst lassen [81]. Zudem wirken Phenobarbital und 3-Methylcholanthren als Enzyminduktor und haben in der embryonalen Putenleber als diese nachweislich einen Effekt [56]. Allerdings zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weder für Phenobarbital noch 3-Methylcholanthren einen promovierenden Effekt auf die Karzinogenese in der embryonalen Putenleber.

Phenobarbital wirkt in Lebern von Nagern [78] und in humanen Leberzellen [82] als Enzyminduktor, ebenso auch 3-Methylcholanthren [82, 83]. Phenobarbital wirkt zwar in Ratten als Promotor der Hepatokarzinogenese, jedoch nicht in Menschen [84] und Goldhamstern [85]. Hier werden unterschiedliche Einflüsse von Phenobarbital deutlich. Offensichtlich wirken Phenobarbital und 3-Methylcholanthren in der embryonalen Putenleber als Enzyminduktoren [56], ohne jedoch die Entwicklung der FAH im Sinne einer Promotion zu fördern. In dieser Hinsicht scheint der Putenembryo dem Menschen ähnlicher als dem Nager zu sein.

5.1.3 Histologische Darstellung von Zellproliferation und -verlust

Für die Ermittlung der Zellproliferation wurden die Methoden 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU)-Assay, Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA)-Assay und Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung untersucht und die für die embryonale Putenleber am besten geeignete ausgewählt. Diese Methoden erfassen unterschiedlich große Zeitfenster des Proliferationsprozesses. Durch BrdU-Einbau werden proliferierende Zellen, die sich während der Inkubation mit BrdU-haltiger Lösung in der S-Phase befinden, detektierbar [86, 87]. Im Gegensatz dazu umfasst die PCNA-Detektion einen längeren Zeitraum des Zellzyklus. Mit dem PCNA-Assay werden neben Zellen der S-Phase auch Zellen der

G1-, G2- und M-Phase angefärbt [88–90]. Beide Methoden führten in embryonaler Putenleber zu BrdU- bzw. PCNA-positiven Zellen. Besonders hervorzuheben sind die stets BrdU- bzw. PCNA-negativen Erythrozyten, die eine interne Negativkontrolle darstellen. Mit einer Hämatoxylin-Gegenfärbung wurden die Zellen besser sichtbar und die Ermittlung der Proliferationsrate vereinfacht. BrdU-positive Zellen waren gut zählbar. Die Methode des BrdU-Assays eignet sich zur Ermittlung der Anzahl proliferierender Zellen in der embryonalen Putenleber. Sie wurde beispielsweise auch zur Ermittlung der Proliferationsrate in Muskelgewebe von Putenembryonen [91] und in Herzgewebe von Hühnerembryonen [92] verwendet.

Der PCNA-Assay war für unsere Untersuchungen im embryonalen Putenlebergewebe nicht geeignet. Fast alle Zellen des Lebergewebes waren positiv, was eine Differenzierung der Proliferationsrate unterschiedlicher Bereiche kaum möglich macht. Die PCNA-negativen Erythrozyten sprechen als eine interne Negativkontrolle gegen eine durch fehlerhafte Durchführung bedingte unspezifische Anfärbung aller Kerne. Von weiteren Modifikationen des PCNA-Assays wurde abgesehen und diese Methode für die embryonale Putenleber als ungeeignet erachtet.

Unter Verwendung HE-gefärbter Leberschnitte konnten proliferierende Zellen anhand der Mitosefiguren identifiziert werden. Sie findet auch in Arbeiten an Tumorgeweben von Ratten [93, 94], Hunden [95] und Menschen [96, 97] Anwendung. Die HE-Färbung ist Standard für die Diagnose und Klassifizierung fokaler hepatozellulärer Veränderungen [35, 98]. Sie bot gegenüber dem BrdU-Assay den Vorteil, dass die Detektion der fokalen hepatozellulären Veränderungen und die Analyse der Zellproliferation in einem Leberschnitt durchgeführt werden konnten. Die von fokalen hepatozellulären Veränderungen und extrafokalem Lebergewebe erstellten Detailaufnahmen waren sehr gut zum einfachen Ermitteln der Zellzahl und der Anzahl proliferierender Zellen geeignet. Zudem war die Durchführung der HE-Färbung im Vergleich zum PCNA- und BrdU-Assay weniger komplex. Von den hier zur Wahl stehenden Methoden zur Untersuchung der Auswirkung der Tumorthapeutika auf die Zellproliferation in embryonaler Putenleber war die Quantifizierung der Mitosefiguren in der HE-Färbung am besten geeignet.

Für die Bestimmung des Zellverlustes stellte sich der TUNEL-Assay nach Anpassung der Methodik an die Erfordernisse des Putengewebes als geeignete Methode unserer Arbeit heraus. Laut Herstellerangaben werden hauptsächlich apoptotische Zellen

markiert [99]. Es ist allerdings bekannt, dass TUNEL-positive Zellen sowohl DNA-Strangbrüche aufgrund von Apoptosen als auch Nekrosen detektieren [100–102]. In Ratten wurden falsch-positive Signale nekrotischer Hepatozyten und die Markierung von Nicht-Hepatozyten als nachteilig, jedoch nicht als Hindernis zur Verwendung dieser Methode, beschrieben [103]. In unserer Arbeit wurden TUNEL-positive Hepatozyten zur Messung des Zellverlustes quantifiziert.

5.1.4 Berechnung von Zellproliferation und -verlust

Im Zentrum der Untersuchungen standen die Wirkung von Sorafenib und Cisplatin auf die induzierten FAH. Neben morphologischen Analysen wurden auch Werte von Zellproliferation und -verlust ermittelt. Bei den hierfür verwendeten Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten und dem TUNEL-Assay unterzogenen Leberschnitten einer Schnittebene handelte es sich um alternierende Schnitte. Dadurch wurde sichergestellt, dass jeweils identische Zellpopulationen untersucht wurden. Folglich lässt sich die aus den HE-gefärbten Leberschnitten ermittelte Hepatozytenanzahl auf die TUNEL-Assay-Schnitte übertragen. Auch für das extrafokale Lebergewebe wurde die Zellzahl in den HE-gefärbten Leberschnitten ermittelt und für die Errechnung von Zellproliferation und -verlust verwendet.

5.2 Charakterisierung der durch DEN induzierten hepatozellulären Veränderungen

Im Vergleich zu Lebern ohne DEN-Einfluss wiesen Lebern aus mit DEN-behandelten Eiern neben den auffälligen fokalen Veränderungen z. T. auch Veränderungen des extrafokalen Lebergewebes auf.

5.2.1 Behandlungsinduzierte Auffälligkeiten im extrafokalen Lebergewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden im extrafokalen Lebergewebe mit zunehmender DEN-Dosis vermehrt Hepatozyten beobachtet, die im Vergleich zu Hepatozyten in Lebern ohne DEN-Behandlung größer waren. Sie zeichneten sich durch Zytoplasmavermehrung und Zellkernvergrößerung aus. Diese sogenannten Megalozyten

[29] oder Hepatozyten mit Karyomegalie [31, 32] wurden auch in einer Arbeit von Enzmann et al. [33] in embryonaler Putenleber beschrieben.

Weiterhin war der Zellverlust im extrafokalen Lebergewebe unter DEN-Einfluss größer, während die Zellproliferation keine Änderungen aufwies. Dieser Befund ist für die hierfür analysierte Dosis von 2 mg DEN auch für adulte Ratten beschrieben worden [104] und ist auch im Einklang mit Arbeiten an wenige Wochen alten Nagern [105, 106]. Es ist bekannt, dass Megalozyten ihre DNA vervielfachen [107, 108], jedoch keine Mitosefiguren aufweisen [109]. Dies könnte die Gleichheit der Proliferationsraten im extrafokalen Lebergewebe in Kontroll- und DEN-Lebern erklären.

Um die Bedeutung der Megalozyten weiter abzuklären, wurde deren Kultivierung in Primärkulturen embryonaler Putenlebern untersucht. Es war möglich, diese aus Lebern der 2 mg DEN- und der 4 mg DEN-Gruppe zu gewinnen. Megalozyten kamen allerdings nur in der 4 mg DEN-Gruppe vereinzelt vor. Im Vergleich zu den histologischen Beobachtungen war der Anteil der Megalozyten in Primärzellkulturen sichtlich geringer. Ausgehend von Lebern der 6 mg DEN-Gruppe war keine Kultivierung möglich. Aus Lebern von Ratten, die eine vergleichsweise ähnliche DEN-Dosis erhielten, konnte eine Primärzellkultur angelegt werden [110]. Eine Abbildung in dieser Veröffentlichung weist einen geringeren Anteil von Megalozyten auf als der Anteil der Megalozyten in HE-gefärbten Schnitten aus Putenlebern der 6 mg DEN-Gruppe. Bei Annahme, dass Megalozyten in Ratten und Puten *in situ* etwa in gleichem Maße vorkommen, scheinen sich auch in Primärzellkulturen aus Rattenlebern weniger Megalozyten als *in situ* kultivieren zu lassen. Dies lässt zu dem Schluss kommen, dass die Primärzellkultur aus Lebern der DEN-Gruppe nicht das Bild der *In-situ*-Situation wiedergibt und nur bedingt zu verwirklichen ist. Hierdurch ist die Primärzellkultur für eventuelle Folgeuntersuchungen zum Verhalten der Megalozyten nur wenig geeignet.

5.2.2 Charakterisierung der fokalen hepatozellulären Veränderungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die fokalen hepatozellulären Veränderungen (FAH) an Hand HE-gefärbter Leberschnitte aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften klassifiziert und zusätzlich wurden Zellproliferation und Zellverlust analysiert. Basierend darauf konnten die FAH in ihrer Gesamtheit und unterschieden nach

verschiedenen Phänotypen untereinander und mit dem extrafokalen Lebergewebe verglichen werden.

Die in der embryonalen Putenleber induzierten FAH sind mit FAH in Nagern gleichzusetzen [19, 20] und werden wie diese [74, 111–113] als Vorstufe des hepatozellulären Karzinoms betrachtet. Im Vergleich zum extrafokalen Lebergewebe waren Zellproliferation und -verlust in den FAH größer. Auch bei der FAH-Induktion mittels DEN in Lebern adulter Ratten wurde beschrieben, dass die Proliferationsrate in FAH höher ist als im extrafokalen Gewebe [114–117]. Jene Arbeiten beschrieben allerdings nicht den Zellverlust. In der embryonalen Putenleber war dieser innerhalb der FAH größer als im extrafokalen Gewebe. Dieses Verhältnis zeigte sich ebenso in durch das Karzinogen N-Nitrosomorpholin (NNM) induzierten Leberläsionen in adulten Ratten [118].

Angelehnt an die Charakterisierung der Läsionen in Ratten [98, 119] wurden FAH in unserer Arbeit durch die Skalierung verschiedener Kriterien katalogisiert. So konnten sie anschließend unabhängig der Betrachtung des histologischen Bildes in Klassen eingeteilt werden. Zum einen wurden die vorgefundenen FAH der embryonalen Putenleber aufgrund des Färbeverhaltens des Zytoplasmas in basophile und eosinophile FAH gruppiert. Dabei bestätigte sich der schon beim Mikroskopieren gewonnene Eindruck: basophile FAH überwogen eindeutig die eosinophilen FAH. Dies bekräftigt die Ergebnisse von Enzmann et al. [27]. In basophilen FAH war die Proliferationsrate minimal größer als in eosinophilen, während der Zellverlust etwa gleich war. Dies ähnelt den Ergebnissen von Untersuchungen in durch NNM induzierten Leberläsionen an Ratten [118]. Dort wurden die FAH annähernd gleich klassifiziert. Gemischte/basophile FAH wiesen mehr proliferierende Zellen auf als klarzellig/eosinophile FAH und annähernd gleich viele apoptotische Zellen. Weiterhin konnten in der embryonalen Putenleber klarzellige FAH detektiert werden. Sie kamen nur spärlich vor. Die Proliferationsrate lag deutlich unter denen der basophilen bzw. eosinophilen FAH. Auch Enzmann et al. [20] und Brunnemann et al. [29] ermittelten in klarzelligen FAH weniger Mitosen als in basophilen und eosinophilen FAH. Klarzellige FAH wurde aufgrund der sehr geringen Anzahl nicht weiter in unsere Untersuchungen einbezogen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zudem auch einige FAH beobachtet, die das umliegende Lebergewebe komprimierten. Ihnen gegenüber stand die Vielzahl der FAH,

die das umliegende Lebergewebe nicht komprimierten. Das beobachtete Mengenverhältnis wurde auch in einem Experiment mit adulten Ratten beschrieben [76]. Die Wichtigkeit der Betrachtung dieser Eigenschaft verdeutlichte sich bei der Analyse des Zusammenhangs der Ausprägung ausgewählter histologischer Parameter und Zellproliferation bzw. Zellverlust der FAH. Komprimierende FAH hoben sich gegenüber nicht komprimierenden FAH durch eine gesteigerte Zellproliferation und verringerten Zellverlust deutlich ab.

Laut Arbeiten zur Untersuchung der Hepatokarzinogenese vollziehen die einzelnen Läsionen einen Wandel des Phänotyps [74, 112, 118, 120]. Sie entwickeln sich vom klarzelligen/eosinophilen über den gemischten/basophilen FAH zur fortgeschrittenen basophilen Läsion. Es besteht die Annahme, dass die jeweilige Proliferationsrate dabei das Wachstumspotenzial des jeweiligen FAH-Typs widerspiegelt [121]. Angewandt auf die vorliegende Arbeit scheinen basophile FAH etwas weiter fortgeschrittene Läsionen als eosinophile und klarzellige FAH zu sein. Beim Vergleich der nicht komprimierenden und komprimierenden FAH dagegen ist der Unterschied deutlich. Gegenüber nicht komprimierenden FAH war in komprimierenden FAH die Mitoserate höher, während die Apoptoserate niedriger war. Dies deutet darauf hin, dass komprimierende FAH stärker wachsen als nicht komprimierende FAH. Aus den Proliferationsstudien von Zerban et al. [118, 121] wird deutlich, dass fortgeschrittene Läsionen mehr proliferierende Zellen als klarzellige, eosinophile oder basophile FAH haben. In embryonaler Putenleber wurden bereits FAH, die das umliegende Gewebe komprimieren beschrieben und als „tumor-ähnliche Läsionen“ bezeichnet, die zudem eine größere Anschnittfläche als nicht komprimierende FAH aufweisen [27]. Auch in unseren Analysen hatten komprimierende FAH eine deutlich größere Anschnittfläche als nicht komprimierende FAH. Dies bekräftigt folgende Annahme von Enzmann et al. [27]: nicht komprimierende FAH gleichen Präneoplasien, während komprimierende FAH den Sprung zu Neoplasien überschritten haben und vergleichbar sind mit fortgeschrittenen Leberläsionen [119, 122].

Die in der vorliegenden Arbeit zusammenhängend durchgeführten Analysen der unterschiedlichen FAH-Typen machen deutlich, dass die in embryonaler Putenleber induzierten Läsionen sowohl in Bezug auf Morphologie als auch in Bezug auf Zellproliferation und -verlust mit denen in adulten Ratten vergleichbar sind. Sie eignen sich dadurch als zusätzliches Modell beispielsweise für Untersuchungen potenzieller Tumorthapeutika.

5.3 Effekte der Tumorthapeutika

5.3.1 Dosisfindung Sorafenib und Cisplatin

An den in der embryonalen Putenleber durch DEN induzierten Präneoplasien und Neoplasien sollten verschiedene Tumorthapeutika untersucht werden. In Dosisfindungsstudien an unbehandelten Puteneiern wurde Sorafenib als Vertreter der zielgerichteten Therapeutika und Cisplatin aus der Gruppe der Zytostatika untersucht. Ergebnisse davon boten die Grundlage für weitere Untersuchungen an mit DEN-behandelten Eiern.

5.3.1.1 Dosisfindung Sorafenib

Während der Therapie beim Menschen wird Sorafenib oral verabreicht [42]. Diese Applikationsform wurde so auf den Putenembryo übertragen, dass die Sorafenib-DMSO-Lösung ins Eiweiß injiziert wurde. Als Tag der Applikation wurde Versuchstag 8 gewählt. Dies entspricht dem Beginn der Leberentwicklung im Putenembryo. In einer Studie von Clement und Mladek [38] konnte an Hühnerembryonen die Biotransformation eines ins Eiweiß injizierten Stoffes bereits nach einer Stunde nachgewiesen werden. Die Injektion erfolgte dabei an Tag 8 der Hühnerentwicklung. Folglich wird auch für den Putenembryo die Biotransformation von Sorafenib angenommen und durch die folgenden Dosisfindungsstudien wurde der Effekt von Sorafenib auf den Putenembryo bestätigt.

Erste Dosisfindungsstudien für Sorafenib an unbehandelten Puteneiern zeigten eine steile Dosis-Wirkungskurve. Im Dosisbereich von 1,4 mg/Ei und 2,2 mg/Ei (14,74 und 23,17 mg Sorafenib pro kg Eigewicht) gab es einen beachtlichen Anstieg der Mortalität von 32 % auf 100 %. Es konnte nur eine Studie gefunden werden, die den Effekt von Sorafenib neben ausgewählten humanen Krebszelllinien auch an normalen Zellen, am Beispiel einer Zelllinie humaner Hepatozyten und an humanen fetalen Hepatozyten, untersuchte [123]. Die dort eingesetzte Sorafenibkonzentration führte bei allen Gruppen zu einer verminderten Zellzahl, d. h. je nach Konzentration führt Sorafenib auch zum Sterben von Nicht-Krebszellen. In unseren Studien wurde die Mortalität als Bewertung der Dosis verwendet. Aus Dosis-Eskalationsstudien ist eine limitierte Dosis aufgrund von Toxizität bekannt [37]. Die akute Toxizität von Sorafenib ist gering [124]. In Mäusen und Ratten wurden für die höchste orale Einmalgabe von

1460 mg Sorafenib pro kg Körpergewicht keine Anzeichen von Toxizität beschrieben. Bei Hunden trat bei der einmaligen oralen Verabreichung von 1370 mg Sorafenib pro kg Körpergewicht Erbrechen auf. In einer 4-wöchigen Studie bei Ratten erwies sich die Mehrfachgabe von Sorafenib ab einer Gesamtdosis von 140 mg/kg Körpergewicht als toxisch. Entwicklungsbiologische Toxizitätsstudien zeigten eine höhere Sensitivität von Säugetierembryonen für Sorafenib. In einem Versuch mit befruchteten Ratten traten bedeutende Fehlbildungen der Embryonen auf [124]. Im Vergleich dazu wurden in den Experimenten unserer Arbeit keine Fehlbildungen durch Sorafenib beobachtet.

Die Dosisfindungsstudien an DEN-Eiern der 6 mg DEN-Gruppe resultierten in hoher Mortalität innerhalb der untersuchten Sorafenib- und auch DMSO-Gruppen. Offensichtlich wirkte sich die nach DEN-Injektion folgende Behandlung negativ auf die Embryoentwicklung der 6 mg DEN-Gruppe aus. Die Kombination 2 mg DEN und DMSO dagegen wies deutlich mehr lebende Embryonen auf. Die vergleichsweise hohe DEN-Dosis von 6 mg DEN war für Untersuchungen des Sorafenibeffektes an induzierten FAH nicht geeignet – es wurde 2 mg DEN pro Ei gewählt. Die Versuche erfolgten mit der Sorafenib-Dosis von höchstens 1 mg/Ei (10,53 mg/kg Eigewicht). Während die Sorafenibdosis von 0,5 mg pro Ei keine Auswirkung auf das Embryoüberleben hatte, war die Mortalität bei der Dosis von 1 mg Sorafenib pro Ei im Vergleich zur Kontrollgruppe (DEN+DMSO) deutlich höher.

In klinischen Studien wurde aufgrund dosislimitierender Toxizität ein enges therapeutisches Fenster beschrieben [125, 126]. Während die therapeutische Sorafenibdosis von 800 mg pro Tag akzeptable toxische Effekte aufwies, wurde bereits für Dosen oberhalb 1200 mg pro Tag eine intolerable Toxizität beschrieben. In Zellkulturversuchen mit hepatozellulären humanen Tumorzellen [127] und verschiedenen nicht-hepatozellulären humanen Tumorzellen wurde ebenfalls eine steile Dosis-Wirkungskurve beschrieben [128–130].

Für die Untersuchungen des Sorafenibeffektes auf die induzierten Leberläsionen wurde die Sorafenib-Dosis von 1 mg pro Ei (10,53 mg/kg Eigewicht) als höchste Dosis gewählt. Diese ist vergleichbar mit der ursprünglich an Kontrolleiern getesteten Anfangsdosis von 1,1 mg Sorafenib pro Ei (11,58 mg/kg Eigewicht), die von der Tagesdosis von 800 mg Sorafenib für einen Patienten mit 70 kg Körpergewicht (11,43 mg/kg Körpergewicht) abgeleitet wurde. Bei Kontrolleiern führte die Verdopplung der Sorafenib-Dosis auf 2 mg pro Ei zum Absterben aller Embryonen. Das

ist in Einklang dem Befund der klinischen Phase I-Studie, in der sich ebenfalls die Verdopplung der empfohlenen Dosis von 800 mg auf 1600 mg als klar toxisch erwies [45]. Die von uns für Dosisfindungsstudien verwendete maximale Sorafenib-Dosis lag mit 24 mg Sorafenib pro Ei (253 mg Sorafenib pro kg Eigewicht) deutlich unter denen, die in toxikologischen Studien eingesetzt wurden [124].

5.3.1.2 Dosisfindung Cisplatin

In der therapeutischen Anwendung beim Menschen werden Platinlösungen intravenös verabreicht [50]. Um dies für den Putenembryo nachzustellen, wurde die Cisplatin-NaCl-Lösung auf die Chorio-Allantois-Membran (CAM) geträufelt. Es wurde angenommen, dass Cisplatin über die stark vaskularisierte CAM resorbiert wird und in den Blutkreislauf gelangt. Selbst auf die CAM von Hühnereiern aufgetragene Tumorzellen wurden im Hühnerembryo wiedergefunden [39].

Für unser Modell der fetalen Putenleber wurde am Beispiel von Cisplatin die Aufnahme von Platin ins Zielorgan Leber mittels atomarer Atomabsorptionsspektrometrie nachgewiesen. Im Gegensatz zu Lebern aus unbehandelten Putenembryonen fand sich in Lebern Cisplatin-behandelter Embryonen Platin (Pt). Die Platinkonzentration von etwa 13 µg Pt/g Leber liegt im Bereich der Ergebnisse anderer Arbeiten. Beispielsweise wurden nach Autopsien 0,5 bis 3,7 µg Pt/g Leber ermittelt [131]. In einem Mausmodell [132] entsprach die intraperitoneal verabreichte Cisplatin-Dosis (8 mg/kg Körpergewicht) etwa der in der vorliegenden Arbeit verwendeten (10 mg/kg Eigewicht) und die nach 6 Tagen ermittelte Platinkonzentration von 24,2 µg Pt/g Leber stimmte mit der Platinkonzentration in der embryonalen Putenleber überein. Ebenso stimmten die ermittelten Platinkonzentrationen anderer Arbeiten an Ratten [133] oder Mäusen [134] mit den Werten von 6,7 bzw. 4 µg Pt/g Leber annähernd mit unseren Werten überein. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Cisplatin-Dosen untersucht und es zeigte sich keine Korrelation zwischen der Cisplatin-Dosis und der gemessenen Platinkonzentration. Andere Arbeiten mit Nagern zeigten, dass der Platiningehalt in der Leber kurz nach Injektion einer Platinlösung ansteigt und anschließend auf einen gleich bleibenden Wert absinkt [134–136]. Dies lässt annehmen, dass auch der „Endwert“ in der embryonalen Putenleber innerhalb eines Tages erreicht ist. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Aufnahme von Platin durch die CAM sättigbar ist.

Die Versuche zur Dosisfindung von Cisplatin an unbehandelten Puteneiern zeigten für die in der vorliegenden Arbeit betrachteten Parameter „Überlebensrate“ eine steile Dosis-Wirkungskurve im Bereich von 0,77 bis 2 mg Cisplatin pro Ei. Mit steigender Cisplatindosis überlebten weniger Embryonen. Auch bei Zellkulturen mit embryonalen Fibroblasten von Mäusen [137] und Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters [138] wirkte sich eine steigende Cisplatin-Dosis negativ auf Anzahl der Kolonien und somit das Überleben aus.

In Dosisfindungsversuchen an DEN-Eiern führte die Kombination 6 mg bzw. 8 mg DEN und die maximale Dosis von 1 mg Cisplatin pro Ei zu einer hohen Embryosterblichkeit. Eventuell spielte das Volumen der applizierten Lösung eine Rolle. Am Beispiel der 2 mg DEN+NaCl-Gruppe war die Überlebensrate bei 1 mL applizierter Lösung 42 % höher als bei 2 mL. Sollten weitere Untersuchungen zu Induktion von Läsionen in embryonalen Putenlebern unter Verwendung von 6 mg DEN durchgeführt werden, kann die Dosisfindungsstudien von Cisplatin mit einem geringeren Volumen wiederholt werden. Da auch Dosisfindungsstudien für Sorafenib an 6 mg DEN-Eiern eine hohe Mortalität zur Folge hatten, scheint diese hohe DEN-Dosis allerdings für Untersuchungen in dieser Arbeit nicht geeignet zu sein. Die Kombination aus einer DEN-Dosis von 2 mg DEN pro Ei und einer Cisplatin-Dosis von 0,25 mg, 0,5 mg und 1 mg pro Ei wies eine akzeptable Überlebensrate auf. Nur in der 1 mg Cisplatin-Gruppe war die Überlebensrate gegenüber der Kontrollgruppe geringer. Für Zellkulturen von humanen Krebszelllinien ist eine steile Dosis-Wirkungskurve beschrieben [139, 140], die auch für DEN-Eier angenommen wird.

Bei Ratten wirkte Cisplatin in frühen Stadien der Embryoentwicklung negativ auf die Überlebensrate [141]. Die dabei getestete höchste Dosis von 3,0 mg/kg Körpergewicht hatte zu einem späteren Zeitpunkt keinen Einfluss auf die Überlebensrate. Jene Dosis entsprach etwa einer in unserer Arbeit verwendeten Dosis (0,25 mg/Ei, angenommen als 2,63 mg/kg Eigewicht), die keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Putenembryonen hatte. Dies bekräftigt den hier gewählten Zeitpunkt der Cisplatin-Applikation auf die CAM.

Für zytotoxische Substanzen (Bsp. Platinkomplexe) steigt die Effektivität, gleichzeitig aber auch die Toxizität mit der Dosis. Demnach ist diese Substanz oft toxisch, wenn die Dosis im effizientesten Bereich liegt [36]. Auch beim Menschen liegen die therapeutische Dosis (120 mg/m^2 Körperoberfläche $\cong 3,45 \text{ mg/kg}$ Körpergewicht) und

die als Überdosierung festgesetzte Dosis (>180 mg Cisplatin/m² Körperoberfläche \cong 5,21 mg/kg Körpergewicht) nahe beieinander. In unserem Modell wurde die Dosis von Cisplatin anhand der Überlebensrate festgesetzt. Aufgrund des hierfür engen Dosis-Wirkungsfensters zwischen 0,5 und 1 mg Cisplatin bei DEN-Eiern scheint die therapeutische Dosis um 1 mg Cisplatin pro Ei zu liegen. Somit ist diese Dosis für unsere Untersuchungen geeignet.

5.3.2 Effekt von Sorafenib auf das embryonale Putenlebergewebe

Sorafenib wird klinisch zur Therapie des fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinoms angewendet. In unserer Arbeit sollte untersucht werden, ob Sorafenib ebenso einen hemmenden Einfluss auf induzierte Tumorstufen (FAH) in embryonaler Putenleber hat. Unerwartet zeigte sich im ersten Experiment verglichen mit der Kontrollgruppe (DEN+DMSO) eine höhere Anzahl FAH nach Behandlung mit DEN und 1 mg Sorafenib [DEN+(1 mg)SF]. Die Zahl von 0,67 FAH-Anschnitten pro 1 cm² Lebergewebe war 2,5-fach größer als in der DEN+DMSO-Gruppe (0,27 FAH-Anschnitten pro 1 cm² Lebergewebe). Ebenso überraschten die Werte des Anteils der FAH vom Lebergewebe. Er war unter Sorafenib-Einfluss doppelt so groß (1992 μ m² pro 1 mm² Lebergewebe verglichen zu 921 μ m² pro 1 mm² Lebergewebe). Ein zweiter Versuch diente der Überprüfung dieses Befundes. Der im Vergleich zur DMSO-Gruppe vergrößerte Anteil und die erhöhte Anzahl der FAH-Anschnitte in der 1 mg Sorafenibgruppe wurden klar und statistisch signifikant bestätigt. Zusätzlich wurde eine niedrigere Sorafenibdosis von 0,5 mg/Ei (5,26 mg/kg Eigewicht) untersucht. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede zur DEN+DMSO-Gruppe, was den Effekt der höheren SF-Dosis von 1 mg pro Ei untermauert. Die morphometrischen Werte der DEN+DMSO- bzw. DEN+(1 mg)SF-Gruppe beider Versuche unterschieden sich. Das Embryo- und Lebergewicht wies keinen Unterschied auf, weshalb die Ursache in einer unterschiedlich starken Schrumpfung der Lebern während der Fixierung vermutet wird. Die Zellkerne (Daten nicht gezeigt) und Leberschnitte im zweiten Versuch waren kleiner als im ersten Versuch. Dies spiegelt sich in Zahl und Größe der Focusanschnitte wieder.

Mit Hilfe stereologischer Analysen ist es möglich, aus den gemessenen FAH-Anschnittflächen der ausgewerteten Lebergewebefläche Schlüsse über die Anzahl FAH pro Lebervolumen (cm³) zu ziehen. Wie auch die tatsächlich gemessenen Werte, wiesen

die für den zweiten konfirmatorischen DEN+SF-Versuch durchgeführten stereologische Analysen (vgl. Kapitel 4.1.8) auf eine Verdopplung der FAH-Anzahl unter Einfluss von 1 mg Sorafenib hin. In der Dosisgruppe von 0,5 mg Sorafenib pro Ei ergaben die stereologischen Berechnungen ebenfalls eine der DMSO-Gruppe entsprechende Anzahl an FAH. Diese Ergebnisse stereologischer Analysen wurden ungeachtet der jeweils angewendeten Rechenmethode erhalten. Dabei zeigte der Vergleich der gemessenen und der berechneten Gewebeanteile der FHA, dass die Berechnung nach Enzmann et al. [72] den tatsächlich gemessenen Werten am nächsten kam.

Die Wirksamkeit von Sorafenib *in vivo* wurde vor allem im Rahmen präklinischer Untersuchungen an Hand von Xenograft-Modellen untersucht. Darin wurde der hemmende Effekt von Sorafenib mit verschiedenen humanen Krebszelllinien nachgewiesen [124, 142, 143].

Mit der hier vorliegenden Studie vergleichbar, untersuchten nur wenige Arbeitsgruppen den Effekt von Sorafenib auf *in vivo* induzierte Tumorstufen bzw. Tumoren innerhalb eines Gewebes. In einem Experiment mit Ratten [144] wurden durch die einmalige Injektion von DEN präneoplastische Leberläsionen – vergleichbar mit denen der embryonalen Putenleber – induziert. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit führte eine anschließende Sorafenib-Behandlung zu einer verminderten FAH-Anzahl. In den Untersuchungen von Carr et al. [144] war die Größe der Versuchsgruppen mit je vier Tieren allerdings sehr gering. Zudem ist die Zahl untersuchter Leberschnitte nicht beschrieben.

Auch transgene Mausmodelle wurden für die Induktion von Leberzellkrebs etabliert [145]. Allerdings gibt es keine Veröffentlichung über den Effekt von Sorafenib auf diese Lebertumoren. Mit diesen Modellen werden hauptsächlich molekulare Mechanismen im Karzinogeneseprozess untersucht [146]. Es konnten Studien mit transgenen Mausmodellen anderer Krebsarten gefunden werden, die den Effekt von Sorafenib untersuchten. In einem transgenen Mausmodell, in dem sich Tumore der Langerhans-Inselzellen entwickeln, führte die Gabe von Sorafenib im Vergleich zur Kontrolle zu einer stark verminderten Tumorgöße und der Tendenz zur Verringerung des Pankreasgewichtes. Extrafokales Gewebe wurde dabei allerdings nicht betrachtet [147]. Daneben wurde in zwei Studien mit einem transgenen Mausmodell für Lungenkrebs die Unwirksamkeit von Sorafenib auf die Anzahl dort induzierter Lungenadenome beschrieben [148, 149].

Der in unserer Arbeit beobachtete tumorfördernde Effekt von Sorafenib wurde auch in anderen Arbeiten beschrieben. So z. B. in der Arbeit von Zhang et al. [150]. Zellen humaner Leberkrebsmetastasen wurden subkutan in Mäuse injiziert. Daraus entstandene Tumore waren in der Sorafenib-Gruppe größer als in der Kontrollgruppe. In einem weiteren Experiment wurden HepG2-Zellen in die Schwanzvene injiziert und der Einfluss von Sorafenib auf entstandene Lungenfokusse untersucht. Der prozentuale Anteil der Fokusse am Lungengewebe war unter Sorafenib-Einfluss größer. Aus diesen Beispielen wird deutlich, dass Sorafenib je nach Modell einen unterschiedlichen Effekt haben kann.

Zur genaueren Charakterisierung der in unserer Arbeit unter Sorafenibeeinfluss beobachteten Vermehrung der FAH in der fetalen Putenleber wurden Zellproliferation und -verlust untersucht. Mit dem in dieser Arbeit etablierten Modell der FAH-Induktion *in situ* ist es möglich die Komponenten „extrafokales Gewebe“ und „fokale Läsion“ zu betrachten. Im extrafokalen Gewebe wirkte sich Sorafenib nicht auf die Zellproliferationsrate aus. Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro 1000 Hepatozyten war dagegen erhöht (DEN+DMSO: 1,77 und DEN+(1 mg)SF: 3,12). Die hohe Standardabweichung des Mittelwertes der DEN+(1 mg)SF-Gruppe war auf den Wert einer Leber zurückzuführen, der sehr hoch war. Diese Leber wurde in der histologischen Analyse als stark nekrotisch beschrieben. Die ohne diesen Wert ermittelte Anzahl TUNEL-positiver Zellen (2,31) relativiert die vorher angenommene hohe Zahl des Zellverlustes und weist auf einen nur gering erhöhten Zellverlust im extrafokalen Gewebe unter Einfluss von Sorafenib hin. Es war anzunehmen, dass Sorafenib Auswirkungen auf Zellproliferation und -verlust des extrafokalen Gewebes hat. Auch Lee et al. postulierten neben der Wirkung auf HCC auch einen Effekt von Sorafenib auf andere Leberbereiche, vor allem auf das den Tumor umgebende Gewebe [151].

Die in der embryonalen Putenleber induzierten FAH wiesen gegenüber dem extrafokalen Lebergewebe eine deutlich höhere Rate von Zellproliferation und Zellverlust, d. h. einen insgesamt gesteigerten Zellumsatz, auf. Durch Sorafenib wurde die Zellproliferation innerhalb der FAH noch stärker erhöht. Auf den Zellverlust innerhalb der FAH dagegen hatte Sorafenib keinen Einfluss. Die Effekte von Sorafenib auf Zellproliferation und -verlust wurden auch in anderen präklinischen Modellen untersucht. In Studien mit einem transgenen Mausmodell für Lungenkrebs wurde durch Sorafenib die Zellproliferation in den Lungenfokussen nicht beeinflusst [148] bzw. vermindert [149]. Diese Ergebnisse unterschieden sich von unseren Beobachtungen.

Auf den Zellverlust innerhalb der Lungenfokusse hatte Sorafenib in beiden genannten Studien keinen Einfluss, was unseren Ergebnissen gleicht.

Neben den als präneoplastisch betrachteten FAH ohne Kompression des umliegenden Lebegewebes wurden weiter fortgeschrittenen FAH, die das umliegende Gewebe komprimierten, unterschieden (siehe Kapitel 5.2.2). Sorafenib hatte einen deutlich unterschiedlichen Effekt auf diese beiden FAH-Typen. In nicht komprimierenden FAH wurde durch Sorafenib die Zellproliferation signifikant erhöht, während der Zellverlust verringert war. In komprimierenden FAH dagegen hatte Sorafenib keinen Effekt auf die Zellproliferation und führte zur deutlichen Erhöhung des Zellverlustes. Diese Unterschiede zeigen sich auch in Bezug auf das Nettowachstum. Gegenüber der DEN+DMSO-Gruppe ist in der DEN+(1 mg)SF-Gruppe das Wachstum von nicht komprimierenden FAH verstärkt und das von komprimierenden FAH verringert. Dieser differenzierte Sorafenibeeinfluss je nach Stadium der Läsion passt gut zu der therapeutischen Anwendung von Sorafenib im fortgeschrittenen Stadium des hepatozellulären Karzinoms (HCC). Unterschiedliche Effekte von Sorafenib auf frühe und späte Läsionen wurden ebenfalls in einem Mausmodell gefunden [152]. Die dort ebenfalls durch DEN-induzierten Leberläsionen wurden in dysplastische Läsionen (Vorstufe des HCC) und HCC eingeteilt. Zellproliferation und -verlust wurden nicht untersucht. Die Größe dysplastischer Läsionen wurde durch Sorafenib nicht beeinflusst, während HCC unter Sorafenib-Behandlung deutlich kleiner waren. Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein –komprimierende FAH waren durch Sorafenib kleiner, während Sorafenib auf die Größe von nicht komprimierenden FAH keinen Einfluss hatte.

Zusammenfassend hatte Sorafenib einen fördernden Effekt auf FAH in der embryonalen Putenleber. Sorafenib erhöhte den Gewebeanteil der FAH in zwei unabhängigen Versuchen (DS1: Faktor +2,2; DS2: Faktor +4,5), die Anzahl FAH pro cm² (DS1: Faktor +2,5; DS2: Faktor +2,3) und steigerte die Mitoserate in den FAH ohne Veränderung des Zellverlustes. Die FAH-Klassifikation ließ allerdings auch einen davon abweichenden Effekt von Sorafenib sichtbar werden. In weiter fortgeschrittenen Läsionen –komprimierenden FAH – zeigte Sorafenib den ursprünglich erwarteten Effekt des verstärkten Zellverlustes. Auch das Nettowachstum der komprimierenden FAH war in der DEN+(1 mg)SF-Gruppe geringer als in der DEN+DMSO-Gruppe.

Die unterschiedliche Wirksamkeit von Sorafenib lässt eine differenzierte Wirkung vermuten. Sorafenib ist ein zielgerichteter Wirkstoff, ausgerichtet auf bestimmte Bestandteile von Signalwegen, die im HCC gegenüber gesunden Leberzellen verändert sind [125]. Eventuell sind diese Ziele in den frühen Läsionen noch nicht ausreichend aktiviert und somit ist kein Ziel für Sorafenib geboten. In verschiedenen Übersichtsarbeiten wird beschrieben, dass HCC verschiedene Subtypen aufweist und diesen entsprechend angepasste Therapien nötig sind [46, 145].

5.3.3 Bedeutung unserer Ergebnisse des Sorafenib-Effektes für die Anwendung beim Menschen

Das Arzneimittel Nexavar[®] mit dem Wirkstoff Sorafenib ist aktuell für die Behandlung von fortgeschrittenem HCC, fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom und differenziertem Schilddrüsenkarzinom zugelassen [153]. Die durchschnittliche Lebenserwartung von Patienten mit HCC liegt bei 7,9 Monaten und wird durch Sorafenib in der Regel um drei Monate verlängert [42]. In Bezug auf die relativ kurze Lebenserwartung stellt eine etwaige gleichzeitige Förderung vorhandener FAH durch Sorafenib kein relevantes Sicherheitsrisiko dar. Dies könnte allerdings von Bedeutung sein, wenn Sorafenib in Patienten mit einer längeren Lebenserwartung eingesetzt wird, beispielsweise als adjuvante Therapie mit kurativer Zielsetzung. Nach der Anwendung gängiger Behandlungsmethoden von HCC im frühen und mittleren Stadium, wie beispielsweise der operativen Entfernung oder der transarteriellen Chemoembolisation, verlängert sich in der Regel die Lebenserwartung signifikant [2]. In Studien wird bereits der Effekt einer anschließenden Sorafenib-Behandlung untersucht [48]. Hierzu weisen die bisherigen Ergebnisse der Anwendung von Sorafenib nach transarterieller Chemoembolisation bei HCC im mittleren Stadium noch in keine klinische Richtung. Eine Studie sieht keinen Unterschied bei der zusätzlichen Anwendung von Sorafenib [154]. Die Effekte von Sorafenib als adjuvante Therapie nach Leberresektion oder lokaler Ablation werden in der noch andauernden STORM-Studie [155] untersucht. Sollte Sorafenib hier einen Vorteil zeigen, wird eine Lebensverlängerung von mehreren Jahren erwartet [156].

In Patienten mit diagnostiziertem HCC weist die Leber vermutlich weitere kleinere, möglicherweise nicht detektierbare Läsionen (Präneoplasien) auf [157]. Es stellt sich die Frage, ob die in unserer Arbeit gefundene Vermehrung der FAH unter Sorafenib in

der HCC-Diagnostik zum Vorschein kommt. Bis jetzt gibt es noch keine Untersuchungen des karzinogenen Potenzials von Sorafenib [153]. Der „chronic rodent bioassay“ (CRB) ist eine Methode zur Überprüfung des karzinogenen Potenzials von Stoffen im Menschen. Spontan treten Lebertumore in Ratten im Bereich von <1 bis 13 % und in Mäusen im Bereich von 1 bis 28 % auf [158]. Wenn die in unserer Arbeit vorgefundene 2-fache Erhöhung der FAH auf ein 2-fach erhöhtes Vorkommen von HCC im CRB übertragen wird, liegt dies wahrscheinlich unterhalb der Empfindlichkeit des CRB. Überdies ist nicht bekannt, welches Verhältnis die Sensitivität des promovierenden Effektes von Sorafenib in der embryonalen Putenleber im Vergleich zur Nagerleber hat. Ein im Vergleich zur embryonalen Putenleber stärkerer fördernder Effekt auf die FAH durch Sorafenib kann somit für Nager oder anderer Säugetiere nicht ausgeschlossen werden. Folglich ist die Überprüfung der Kanzerogenität von Sorafenib vor einer Verwendung in Patienten mit einer erheblich größeren Lebenserwartung vernünftig. Zudem sollten Patienten nach einer Sorafenib-Behandlung langfristig auf das Auftreten von Lebertumoren untersucht werden.

5.3.4 Effekt von Cisplatin auf das embryonale Putenlebergewebe

In Bezug auf die in der embryonalen Putenleber induzierten fokalen hepatozellulären Veränderungen (FAH) zeigte sich keine deutliche Wirkung von Cisplatin. Beispielsweise verringerte sich die Fläche der FAH pro 1 mm² Leber und die Anzahl FAH pro 1 cm² Leber unter Einfluss aller untersuchten Cisplatin-Dosen. Allerdings ließ sich keine Dosisabhängigkeit erkennen. Auch unterschieden sich die Ergebnisse der niedrigsten Cisplatin-Dosisgruppe (0,25 mg Cisplatin pro Ei) beider Versuche. Die morphometrischen Untersuchungen belegen daher keinen eindeutigen Effekt von Cisplatin. Die morphometrischen Werte der DEN+NaCl- bzw. der jeweiligen DEN+Cisplatin-Gruppe beider Versuche unterschieden sich. Das Embryo- und Lebergewicht wies keinen Unterschied auf, weshalb die Ursache in einer unterschiedlich starken Schrumpfung während der Fixierung der Lebern vermutet wird. Die Zellkerne (Daten nicht gezeigt) und Leberschnitte im ersten Versuch waren kleiner als im zweiten Versuch. Dies spiegelt sich in Zahl und Größe der Focusanschnitte wieder. Innerhalb der FAH embryonaler Putenleber erhöhte Cisplatin sowohl Zellproliferation als auch Zellverlust. Allerdings waren diese auch im extrafokalen Gewebe unter Einfluss von 0,5 mg und 1 mg Cisplatin erhöht. Dies zeigte sich auch bei der Betrachtung des angenommenen Nettowachstums. Der etwaige Effekt durch

Cisplatin in den FAH scheint demnach nicht FAH spezifisch zu sein. Die Steigerung von Zellproliferation und -verlust in den FAH stand zudem mit keinem der etwaigen Änderungen der morphologischen Werte in Beziehung.

Diese uneinheitlichen Ergebnisse zeigen sich auch beim Vergleich verschiedener Arbeiten, die den Einfluss von Cisplatin auf Leberzelllinien *in vitro* und in Xenograftmodellen untersuchten. Wu et al. [159] fanden am Beispiel einer Cisplatinkonzentration zytotoxische Effekte innerhalb HCC Zelllinien, während normale Leberzellen unbeeinflusst blieben. Guo et al. [160] zeigten, dass Cisplatin abhängig von der Konzentration einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum innerhalb Leberkrebszelllinien haben kann, allerdings fanden sie im untersuchten Xenograft-Modell keinen Einfluss von Cisplatin auf die Tumorgroße. In den Untersuchungen von Chen et al. [161] hatte eine dort verwendete Cisplatin-Konzentration keinen Einfluss auf die Zellproliferation innerhalb einer HCC-Zelllinie und wirkte allerdings hemmend auf die Tumorgroße des entsprechenden Xenograft-Modells. In den Tumoren der Xenograft-Modelle wurden Zellproliferation und -verlust allerdings nicht untersucht.

Obwohl Cisplatin beim Menschen bei der Behandlung einer Vielzahl von Tumoren einen festen Platz hat, wird es zur Behandlung des humanen hepatozellulären Karzinoms nicht empfohlen. Auch in unseren Versuchen fand sich kein überzeugender Beleg für eine Wirkung auf die fokalen Veränderungen der embryonalen Putenleber. Selbst die Unterscheidung der FAH nach die Umgebung komprimierend und nicht komprimierend ließ keinen unterschiedlichen Effekt von Cisplatin erkennen. Sowohl die Zellproliferation als auch der Zellverlust beider FAH-Typen schien sich unter Einfluss von Cisplatin zu erhöhen. Allerdings waren die etwaigen Unterschiede nicht signifikant. Für das Nettowachstum ergaben sich ebenso unklare Ergebnisse für den Effekt von Cisplatin.

Die Unterscheidung der FAH in basophile und eosinophile FAH zeigte einen vagen Effekt von Cisplatin auf eosinophile FAH. Während in den hauptsächlich vorkommenden basophilen FAH sowohl die Zellproliferation als auch der Zellverlust erhöht zu sein schienen, war dagegen die Zellproliferation in den seltener vorkommenden eosinophilen FAH tendenziell verringert und der Zellverlust tendenziell erhöht. Die Werte des Nettowachstums deuteten ebenfalls auf ein eine Wachstumssteigerung der basophilen FAH durch Cisplatin und eine

Wachstumshemmung der eosinophilen FAH hin. Dies war besonders deutlich bei der Dosis von 1 mg CP, die als therapeutische Dosis des Putenembryos angenommen wurde (Vgl. Kapitel 5.3.2.1).

Eine neue Art von transarterieller Chemoembolisation (TACE) mit Cisplatin zeigte bei Patienten mit HCC im mittleren Stadium, die bestimmte Voraussetzungen erfüllten, vielversprechende Ergebnisse [162]. In unserer Arbeit schien Cisplatin auch einen wachstumsmindernden Einfluss auf die eosinophilen FAH zu haben, die als anfängliche Läsion des HCC gelten [118]. In fortgeschrittenem HCC jedoch stellt Cisplatin aktuell weder in der Anwendung als TACE noch als systemische Chemotherapie eine Behandlungsmethode dar [163], was sich mit unseren Ergebnissen der Unwirksamkeit von Cisplatin in Bezug auf als fortgeschrittene Läsionen anzunehmende komprimierende FAH deckt. Das hier etablierte Putenmodell spiegelt somit die Anwendungsmöglichkeiten von Cisplatin bei Leberkrebs wieder und könnte als zusätzliche Testmethode für potenzielle Arzneistoffe eingesetzt werden.

5.4 Putenembryo als Modell zum Test potenzieller Tumorthapeutika

Für den Test potenzieller Tumorthapeutika geben schnell durchführbare Tests mit Krebszelllinien einen ersten Überblick der pharmakologischen Aktivität. Für Therapieansätze des humanen Leberzellkrebsses finden verschiedene humane HCC-Zelllinien Anwendung [164]. Allerdings fehlen in den hierfür einschichtig wachsenden Zellkulturen Einflüsse eines Gewebeverbandes und eines Organismus. Dies ist bei *In-vivo*-Modellen gegeben. Zur Untersuchung des HCC stehen sie in einer Vielzahl zur Verfügung [21, 165]. Einige eignen sich zur Analyse der Veränderungen während der Hepatokarzinogenese und andere finden hauptsächlich beim Test potenzieller Tumorthapeutika Anwendung [145]. In unterschiedlichen Xenograft-Modellen können humane Krebszellen in immundefiziente Mäuse eingebracht werden und zur Tumorentwicklung führen. Die subkutane Injektion der Zellen ermöglicht dabei eine einfache Beobachtung und Untersuchung des Tumors. Werden die Zellen in das Gewebe injiziert, dem sie entstammen, entwickelt sich der Tumor in seiner ursprünglichen Umgebung. Allerdings sind die Induktion und die Sichtbarmachung der Tumore aufwändig und durch die gegebene Immundefizienz wird kein genaues Bild des humanen Krebses abgebildet [146, 164]. Die Untersuchung potenzieller

Tumorthapeutika in Xenograft-Modellen ist ein erster Hinweis der Wirksamkeit *in vivo*, gleicht jedoch nicht immer der Wirkung dieser Stoffe beim Menschen [166]. Diese Nachteile werden vermieden, wenn Krebs chemisch oder durch genetische Veränderungen induziert wird. In den Modellorganismen Ratte und Maus findet hauptsächlich DEN für die chemische Induktion von HCC Anwendung [145, 146]. Sie ermöglicht eine zuverlässige und reproduzierbare Induktion von Leberläsionen [145], die auch für den Putenembryo beschrieben ist [27] und ebenso in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde.

In der Literatur finden sich neben Mausmodellen auch Untersuchungen mit Vogelembryonen. Beispielsweise wachsen Tumorzellen auf der Chorio-Allantois-Membran von Hühnereiern. Dies wird für die Untersuchung der Angiogenese in Tumorknoten in einem unkomplizierten *In-vivo*-Modell genutzt [17]. Auch auf der Chorio-Allantois-Membran von Putenembryonen wachsen Zellen von Tumorzelllinien als Tumorknoten aus [167]. Weiterhin lassen sich in verschiedenen Vogelembryonen Tumorstufen in der Leber – FAH – induzieren [21, 29]. Putenembryonen haben sich dafür als geeigneter Modellorganismus erwiesen. In Hühnerembryonen konnten keine FAH induziert werden, wie vorhergehende Versuche unserer Arbeitsgruppe in drei Versuchen unter Verwendung verschiedener DEN-Dosen zeigten. Während sich in Putenembryonen ab einer DEN-Dosis von 2 mg pro Ei (\cong 21,0 mg DEN pro kg Putenei) FAH induzieren ließen, führte bei Hühnerembryonen die Dosis von 1 mg DEN pro Ei (\cong 15,4 mg DEN pro kg Hühnerei) zum Sterben aller Embryonen (siehe Anhang Tabelle 88). Die höhere Sensitivität in Hühnerembryonen im Vergleich zu Putenembryonen wurde auch am Beispiel eines anderen toxischen Stoffes beschrieben [168]. In den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe brachten niedrigere DEN-Dosen lebende Hühnerembryonen hervor, die jedoch keine FAH aufwiesen. Wahrscheinlich kann in Hühnerembryonen keine hinreichende Dosis zur FAH-Induktion eingebracht werden. Wie eine Studie in verschiedenen Laboren zeigte, war die Induktion der FAH in Putenlebern verlässlich [27]. Die FAH sind mit denen in der Nagerleber vergleichbar und mit präneoplastischen und neoplastischen Läsionen des HCC vergleichbar [19, 20].

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Untersuchung der Effekte der Tumorthapeutika Sorafenib und Cisplatin auf die induzierten FAH. Grindberg et al. [169] nutzten ebenfalls den Putenembryo als Modellorganismus zum Test potenzieller Arzneistoffe. Dabei wurden Tumorzellen über die Blutgefäße der Chorio-Allantois-

Membran in den Embryo injiziert und anschließend der Effekt eines anti-neoplastischen Stoffes auf das Auswachsen der Zellen untersucht. Sorafenib ist das erste in der EU und den USA zugelassene Tumorthapeutikum zur Behandlung des fortgeschrittenen humanen HCC [42, 143]. In unserem Modell der embryonalen Putenleber zeigte sich für Sorafenib auf den ersten Blick eine unerwartete Steigerung der FAH-Anzahl. Analysen von Zellproliferation und -verlust innerhalb der Subtypen der induzierten FAH wiesen allerdings auf eine inhibierende Wirkung von Sorafenib auf komprimierende FAH hin. Dieser FAH-Typ ist mit fortgeschrittenen Läsionen gleichsetzbar. Die bekannte Wirkung von Sorafenib auf Läsionen des fortgeschrittenen humanen HCC bestätigte sich somit.

Das zweite getestete Tumorthapeutikum war Cisplatin. Aufgrund seiner allgemein zytotoxischen Wirkung wird es bei verschiedenen Krebsarten eingesetzt. Viele Studien untersuchten den Einsatz von Cisplatin in diversen Arten der Mono- oder Kombinationstherapie zur Behandlung unterschiedlicher Stadien des humanen HCC [170, 171]. Dabei gibt es allerdings kein spezifisches Behandlungsschema für den Einsatz von Cisplatin zur Therapie des humanen HCC. Diese Varianzen spiegelten sich auch im Putenmodell wieder, in dem Cisplatin keinen eindeutigen Effekt auf die FAH-Gesamtheit zeigte. Cisplatin schien nur auf eosinophile Läsionen der embryonalen Putenleber einen Effekt zu haben.

Die Wirkung der verwendeten Tumorthapeutika auf DEN-induzierte Läsionen der embryonalen Putenleber schien deren Wirkung in der therapeutischen Anwendung beim humanen HCC zu reflektieren. Das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Putenmodell ist somit als zusätzlicher Test potenzieller Arzneistoffe für Leberzellkrebs geeignet. Der Effekt der untersuchten Tumorthapeutika Sorafenib und Cisplatin auf die induzierten Läsionen wurde in je zwei Versuchen untersucht. Die Ergebnisse in Bezug auf die Wirkung des jeweiligen Tumorthapeutikums auf Embryogewicht, Lebergewicht und Entwicklung der FAH stimmten gut überein. Vorteilhaft am Modell der embryonalen Putenleber ist, dass sich der Tumor in seiner natürlichen Umgebung entwickelt und sowohl Effekte auf diesen und auf das nicht-tumorale Gewebe innerhalb eines Experimentes untersucht werden können. Gegenüber Mausmodellen weist das embryonale Putenlebermodell Vorteile auf. Wegen der Einstufung als Nicht-Tiermodell werden Antragstellung und Versuchsdurchführung vereinfacht. Weiterhin bietet es einen Zeitvorteil. Während die Induktion von hepatozellulären Veränderungen in Mäusen mehrere Monate in Anspruch nimmt, haben sich in der embryonalen Putenleber

schon innerhalb von 24 Tagen präneoplastische und auch neoplastische Veränderungen entwickelt. Überdies sind die Kosten der Durchführung der Experimente geringer, z. B. durch die Inkubation der Puteneier in einem Brutschrank im Gegensatz zur Haltung von Mäusen in einem Tierstall. Durch DEN induzierte Veränderungen der embryonalen Putenleber können daher eine sinnvolle Ergänzung zu den etablierten präklinischen Methoden zur Untersuchung von antitumoralen Wirkstoffen sein.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit der embryonalen Putenleber als Modell zum Test potenzieller Tumorthapeutika untersucht. Es konnten verlässlich fokale hepatozelluläre Veränderungen (foci of altered hepatocytes, FAH) induziert werden. Diese glichen FAH, die in Lebern von Nagetieren beschrieben wurden und präneoplastischen und neoplastischen Veränderungen des humanen hepatozellulären Karzinoms (HCC) entsprechen. Die Untersuchung des Effektes der Tumorthapeutika Sorafenib und Cisplatin auf die FAH in embryonalen Putenlebern war das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit. Sorafenib wird zur Therapie des fortgeschrittenen humanen HCC angewendet. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich deutliche Unterschiede in der Wirksamkeit von Sorafenib. Auf fortgeschrittene (neoplastische) FAH zeigte sich ein hemmender Einfluss. In diesen Läsionen wurde durch die Behandlung mit Sorafenib die Zahl der TUNEL-positiven, d.h. zumeist apoptotischen Zellen, gesteigert. Dies steht mit der therapeutischen Anwendung von Sorafenib gut im Einklang. Weniger stark veränderte präneoplastische FAH wurden durch Sorafenib im Modell der embryonalen Putenleber allerdings vermehrt. Durch die Behandlung mit Sorafenib wurde in diesen Läsionen die Zellproliferation gesteigert. Da die Lebenserwartung von Patienten mit fortgeschrittenem HCC durch Sorafenib in der Regel um drei Monate verlängert wird, stellt eine etwaige gleichzeitige Förderung vorhandener FAH durch Sorafenib jedoch kein relevantes Sicherheitsrisiko dar. Dagegen ist dies in Bezug auf die Frage einer möglichen Anwendung von Sorafenib bei HCC im frühen und mittleren Stadium, beispielsweise als adjuvante Therapie, ein wichtiger Befund. Folglich erscheint die Überprüfung der Kanzerogenität von Sorafenib sinnvoll. Das zweite untersuchte Tumorthapeutikum – Cisplatin – findet bei der Behandlung einer Vielzahl von Tumoren Anwendung, wird jedoch nicht als Monotherapeutikum zur Behandlung des humanen HCC empfohlen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, dass Cisplatin (anders als Sorafenib) keinen deutlichen Effekt auf (prä)neoplastische hepatozelluläre Veränderungen hat.

Zusammenfassend schien die Wirkung der untersuchten Tumorthapeutika auf induzierte Läsionen der embryonalen Putenleber deren Wirkung in der therapeutischen Anwendung beim humanen HCC zu reflektieren.

In der Erforschung potenzieller Arzneimittel zur Behandlung von Krebserkrankungen finden verschiedene Modelle Anwendung. Mit *In-vitro*-Modellen kann eine große Anzahl neuer Stoffe an einer Vielzahl verschiedener etablierter Tumorzelllinien untersucht werden. Die Durchführung der *In-vitro*-Modelle ist schnell, einfach und gut standardisierbar. Jedoch fehlt die Einbeziehung etwaiger Wirkungen des Stoffes auf gesunde Zellen. Die vielfach angewendeten Tierversuche, in denen humane Krebszellen als Tumoren in geeigneten Nagetiermodellen wachsen, stellen die klinische Situation besser nach. Allerdings befindet sich der Tumor dabei nicht in der „natürlichen“ Umgebung des Wirtsorganismus, denn in diesen Nagetiermodellen wachsen humane Krebszellen in Nagern. Der hier vorgestellte experimentelle Ansatz der embryonalen Putenleber ist ein Nicht-Nagermodell, in dem sich Tumore in ihrer natürlichen Umgebung entwickeln und sowohl Effekte auf diese als auch auf das nicht-tumorale Gewebe innerhalb eines Experimentes untersucht werden können. Durch Diethylnitrosamin induzierte Veränderungen der embryonalen Putenleber können daher eine sinnvolle Ergänzung zu den etablierten präklinischen Methoden zur Untersuchung von antitumoralen Wirkstoffen sein.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Cao H, Phan H, Yang L. Improved chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *Anticancer research* 2012; 32: 1379 – 1386
- 2 Tinkle CL, Haas-Kogan D. Hepatocellular carcinoma: natural history, current management, and emerging tools. *Biologics : targets & therapy* 2012; 6: 207 – 219
- 3 Severi T, van Malenstein H, Verslype C, van Pelt JF. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. *Acta Pharmacologica Sinica* 2010; 31: 1409 – 1420
- 4 Maluccio M, Covey A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma. *CA: a cancer journal for clinicians* 2012; 62: 394 – 399
- 5 Asghar U, Meyer T. Are there opportunities for chemotherapy in the treatment of hepatocellular cancer? *Journal of Hepatology* 2012; 56: 686 – 695
- 6 Williams GM. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* 2001; 166: 3 – 10
- 7 Tanaka T, Shimizu M, Kochi T, Moriwaki H. Chemical-induced Carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Medicine* 2013; 5: 203 – 209
- 8 Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P LF, Lopes C. Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2007; 79: 593 – 616
- 9 Suggitt M, Bibby MC. 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2005; 11: 971 – 981
- 10 Burger AM, Fiebig H. Preclinical Screening for New Anticancer Agents. In: Figg WD, McLeod HL (Hrsg). *Handbook of anticancer pharmacokinetics and pharmacodynamics* Totowa, N.J: Humana Press, 2004: 29 – 44
- 11 Baguley BC, Hicks KO, Wilson WR. Tumor Cell Cultures in Drug Development. In: Baguley BC, Kerr DJ (Hrsg). *Anticancer drug development* San Diego: Academic Press, 2002: 269 – 284
- 12 Benbrook DM. Organotypic cultures represent tumor microenvironment for drug testing. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2006: 143 – 148
- 13 Hoffman RM. Orthotopic Metastatic Mouse Models for Anticancer Drug Discovery and Evaluation: a Bridge to the Clinic. *Investigational New Drugs* 1999; 17: 343 – 360
- 14 Sausville EA, Burger AM. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Research* 2006; 66: 3351-4, discussion 3354
- 15 Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *The American journal of pathology* 2007; 170: 793 – 804

- 16 Kapetanovi I (Hrsg). Drug Discovery and Development - Present and Future: InTech, 2011
- 17 Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology* 2008; 49: 131 – 135
- 18 Gabrielli MG, Accili D. The Chick Chorioallantoic Membrane: A Model of Molecular, Structural, and Functional Adaptation to Transepithelial Ion Transport and Barrier Function during Embryonic Development. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 2010: 1 – 12
- 19 Enzmann H, Kaliner G, Watta-Gebert B, Löser E. Foci of altered hepatocytes induced in embryonal turkey liver. *Carcinogenesis* 1992; 13: 943 – 946
- 20 Enzmann H, Kühlem C, Kaliner G, Löser E, Bannasch P. Rapid induction of preneoplastic liver foci in embryonal turkey liver by diethylnitrosamine. *Toxicologic Pathology* 1995; 23: 560 – 569
- 21 Enzmann H, Brunnemann KD. The in ovo carcinogenicity assay (IOCA): a review of an experimental approach for research on carcinogenesis and carcinogenicity testing. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 1997; 2: c30-9
- 22 NTP. Report on Carcinogens, Twelfth Edition, 2011
- 23 Verna L, Whysner J, Williams GM. N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology & therapeutics* 1996; 71: 57 – 81
- 24 IARC. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some N-nitroso compounds. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man 1978; 17: 1 – 349
- 25 Pegg AE. Alkylation and subsequent repair of DNA after exposure to dimethylnitrosamine and related carcinogens. In: Hodgson E, Bend JR, Philpot RM (Hrsg). *Reviews in biochemical toxicology* New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier, 1983: 83 – 133
- 26 Saffhill R, Margison GP, O'Connor PJ. Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1985; 823: 111 – 145
- 27 Enzmann H, Brunnemann K, Iatropoulos M et al. Inter-laboratory comparison of turkey in ovo carcinogenicity assessment (IOCA) of hepatocarcinogens. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2013; 65: 729 – 735
- 28 Okano J. Sequential analysis of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Experimental and therapeutic medicine* 2011; 3: 371 – 378
- 29 Brunnemann KD, Enzmann HG, Perrone CE, Iatropoulos MJ, Williams GM. In ovo carcinogenicity assay (IOCA): evaluation of mannitol, caprolactam and nitrosoproline. *Archives of toxicology* 2002; 76: 606 – 612
- 30 Taper HS, Bannasch P. Histochemical differences between so-called megalocytosis and neoplastic or preneoplastic liver lesions induced by N-nitrosomorpholine. *European Journal of Cancer* 1979; 15: 189 – 196

- 31 Enzmann HG, Brunnemann KD, Kaestner B, Iatropoulos MJ, Williams GM. Dose-dependent induction of preneoplastic lesions by the tobacco-specific nitrosamine carcinogen NNK in the in ovo carcinogenicity assessment (IOCA) assay. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2014; 66: 35 – 40
- 32 Maronpot RR, Yoshizawa K, Nyska A et al. Hepatic Enzyme Induction: Histopathology. *Toxicologic Pathology* 2010; 38: 776 – 795
- 33 Enzmann H, Kühlem C, Löser E, Bannasch P. Dose dependence of diethylnitrosamine-induced nuclear enlargement in embryonal turkey liver. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1351 – 1355
- 34 Bannasch P, Mayer D, Hacker HJ. Hepatocellular glycogenesis and hepatocarcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1980; 605: 217 – 245
- 35 Thoolen B, Maronpot RR, Harada T et al. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Hepatobiliary System. *Toxicologic Pathology* 2010; 38: 5S
- 36 Eisenhauer EA, O'Dwyer PJ, Christian M, Humphrey JS. Phase I clinical trial design in cancer drug development. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2000; 18: 684 – 692
- 37 Le Tourneau C, Lee JJ, Siu LL. Dose Escalation Methods in Phase I Cancer Clinical Trials. *Journal of the National Cancer Institute* 2009; 101: 708 – 720
- 38 Clement B, Mladek C. Biotransformationsuntersuchungen im Hühnerei. Teil 1: Metabolische Umwandlung von 7-Ethoxycumarin. *Die Pharmazie* 1995; 50: 207 – 210
- 39 Deryugina EI, Quigley JP. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and Cell Biology* 2008; 130: 1119 – 1130
- 40 Keating GM, Santoro A. Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs* 2009; 69: 223 – 240
- 41 Xie B, Wang DH, Spechler SJ. Sorafenib for Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Systematic Review. *Digestive Diseases and Sciences* 2012; 57: 1122 – 1129
- 42 Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *The New England journal of medicine* 2008; 359: 378 – 390
- 43 Cervello M, McCubrey JA, Cusimano A, Lampiasi N, Azzolina A, Montalto G. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon. *Oncotarget* 2012; 3: 236 – 260
- 44 Wei Y, Doria C, Liu Y. Targeted Therapies in the Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 2013; 7: 87 – 102
- 45 Strumberg D. Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. *Drugs of today* 2005; 41: 773 – 784
- 46 Kelley RK, Venook AP. Novel Therapeutics in Hepatocellular Carcinoma: How Can We Make Progress? *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 2013; 33: e137

- 47 Lee JK, Abou-Alfa GK. An Update on Clinical Trials in the Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2013; 47: S16
- 48 Di Maio M, Daniele G, Piccirillo MC et al. Potentiality and Boundaries of Use of Sorafenib in Patients with Hepatocellular Carcinoma: Awaiting the Results of Ongoing Clinical Trials. *Cancers* 2012; 4: 549 – 565
- 49 Klein AV, Hambley TW. Platinum Drug Distribution in Cancer Cells and Tumors. *Chemical Reviews* 2009; 109: 4911 – 4920
- 50 TEVA. Cis-GRY®. Fachinformation 2012;
- 51 Burger H, Loos WJ, Eechoute K, Verweij J, Mathijssen RH, Wiemer EA. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resistance Updates* 2011; 14: 22 – 34
- 52 Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7: 573 – 584
- 53 Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2010; 1806: 172 – 182
- 54 Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions* 2010; 39: 8113
- 55 Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews. Drug discovery* 2005; 4: 307 – 320
- 56 Perrone CE, Ahr H, Duan JD et al. Embryonic turkey liver: activities of biotransformation enzymes and activation of DNA-reactive carcinogens. *Archives of toxicology* 2004; 78: 589 – 598
- 57 Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 3. Aufl. New York: Garland Pub., 1994
- 58 Buddecke E. *Pathobiochemie. Ein Lehrbuch für Studierende und Aerzte* Berlin, New York: De Gruyter, 1978
- 59 Hayashi T, Sano T, Kutsuna N, Kumagai-Sano F, Hasezawa S. Contribution of anaphase B to chromosome separation in higher plant cells estimated by image processing. *Plant & cell physiology* 2007; 48: 1509 – 1513
- 60 Wolniak SM, Larsen PM. Changes in the metaphase transit times and the pattern of sister chromatid separation in stamen hair cells of *Tradescantia* after treatment with protein phosphatase inhibitors. *Journal of cell science* 1992; 102: 691 – 715
- 61 Kudriavtsev IS, Zatssepina OV. The structure of the centromeric region and chromosome behavior in the anaphase after incubating murine cells with the fluorochrome Hoechst 33258. *Tsitologiya* 1993; 35: 30 – 35
- 62 Saraste A. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 2000; 45: 528 – 537
- 63 Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35: 495 – 516
- 64 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 1992; 119: 493 – 501

- 65 Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J The journal of histochemistry and cytochemistry* 1999; 47: 1101 – 1110
- 66 Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 1990; 11: 847 – 853
- 67 Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JF, Parnavelas JG. Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *The Journal of neuroscience* 1997; 17: 1075 – 1085
- 68 Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995; 21: 1465 – 1468
- 69 Stahelin BJ, Marti U, Solioz M, Zimmermann H, Reichen J. False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *Molecular pathology* 1998; 51: 204 – 208
- 70 Fullman RL. Measurement of particle sizes in opaque bodies. *Transactions AIME* 1953: 447 – 452
- 71 Pugh TD, King JH, Koen H et al. Reliable stereological method for estimating the number of microscopic hepatocellular foci from their transections. *Cancer Research* 1983; 43: 1261 – 1268
- 72 Enzmann H, Edler L, Bannasch P. Simple elementary method for the quantification of focal liver lesions induced by carcinogens. *Carcinogenesis* 1987; 8: 231 – 235
- 73 Romeis B, Mulisch M, Welsch U. *Romeis Mikroskopische Technik*. 18. Aufl. Dordrecht: Springer, 2010
- 74 Enzmann H, Bannasch P. Potential significance of phenotypic heterogeneity of focal lesions at different stages in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1607 – 1612
- 75 Williams GM, Brunnemann KD, Iatropoulos MJ, Smart DJ, Enzmann HG. Production of liver preneoplasia and gallbladder agenesis in turkey fetuses administered diethylnitrosamine. *Archives of toxicology* 2011; 85: 681 – 687
- 76 Williams GM, Gebhardt R, Sirma H, Stenbäck F. Non-linearity of neoplastic conversion induced in rat liver by low exposures to diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 1993; 14: 2149 – 2156
- 77 Williams GM, Iatropoulos MJ, Jeffrey AM. Mechanistic basis for nonlinearities and thresholds in rat liver carcinogenesis by the DNA-reactive carcinogens 2-acetylaminofluorene and diethylnitrosamine. *Toxicologic Pathology* 2000; 28: 388 – 395
- 78 Whysner J, Ross PM, Williams GM. Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacology & therapeutics* 1996; 71: 153 – 191
- 79 Kim HC, Lee YS, Nishikawa A. Enhancing effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on GST-P-positive liver cell foci development in a new

- medium-term rat liver bioassay using D-galactosamine. *Journal of toxicology and environmental health* 1997; 50: 519 – 528
- 80 Gradelet S. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism. *Carcinogenesis* 1998; 19: 403 – 411
- 81 Hoch-Ligeti C, Argus MF, Arcos JC. Combined carcinogenic effects of dimethylnitrosamine and 3-methylcholanthrene in the rat. *Journal of the National Cancer Institute* 1968; 40: 535 – 549
- 82 Marselos M, Strom SC, Michalopoulos G. Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on aldehyde dehydrogenase activity in cultures of HepG2 cells and normal human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* 1987; 62: 75 – 88
- 83 Astrom A, Birberg W, Pilotti A, DePierre JW. Induction of different isozymes of cytochrome P-450 and of microsomal epoxide hydrolase in rat liver by 2-acetylaminofluorene and structurally related compounds. *European Journal of Biochemistry* 1986; 154: 125 – 134
- 84 McLean A, Driver H, Lowe D, Sutheland I. Thresholds for tumor promotion by phenobarbital after nitrosamine exposure in rat and man. *Toxicology Letters* 1986; 31(Suppl.): 200
- 85 Diwan BA, Ward JM, Anderson LM, Hagiwara A, Rice JM. Lack of effect of phenobarbital on hepatocellular carcinogenesis initiated by N-nitrosodiethylamine or methylazoxymethanol acetate in male Syrian golden hamsters. *Toxicology and applied pharmacology* 1986; 86: 298 – 307
- 86 Leif RC, Stein JH, Zucker RM. A short history of the initial application of anti-5-BrdU to the detection and measurement of S phase. *Cytometry* 2004; 58: 45 – 52
- 87 Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain research reviews* 2007; 53: 198 – 214
- 88 Eldrige SR, Butterworth BE, Goldsworthy TL. Proliferating cell nuclear antigen: a marker for hepatocellular proliferation in rodents. *Environmental health perspectives* 1993; 101 Suppl 5: 211 – 218
- 89 Foley JF, Dietrich DR, Swenberg JA, Maronpot RR. Detection and Evaluation of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Rat Tissue by an Improved Immunohistochemical Procedure. *Journal of Histotechnology* 14 (1991), 4, pp. 237-241 1991; 14: 237 – 241
- 90 Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Experimental cell research* 1986; 166: 209 – 219
- 91 Moore DT, Ferket PR, Mozdziak PE. Muscle Development in the Late Embryonic and Early Post-Hatch Poult. *International Journal of Poultry Science* 2005; 4: 138 – 142
- 92 Drake VJ, Koprowski SL, Hu N, Smith SM, Lough J. Cardiogenic effects of trichloroethylene and trichloroacetic acid following exposure during heart

- specification of avian development. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2006; 94: 153 – 162
- 93 Broxup BR, Valli VEO, Losos GL, Percy DH, Farber E, Mcmillan I. Morphometric Evaluation of Hepatocellular Proliferative Lesions in the Rat Liver. *Toxicologic Pathology* 1988; 16: 401 – 417
- 94 Solt DB, Medline A, Farber E. Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *The American journal of pathology* 1977; 88: 595 – 618
- 95 Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF, London CA. Mitotic Index Is Predictive for Survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Veterinary Pathology* 2007; 44: 335 – 341
- 96 Hasebe T, Iwasaki M, Akashi-Tanaka S et al. Prognostic significance of mitotic figures in metastatic mammary ductal carcinoma to the lymph nodes. *Human Pathology* 2011; 42: 1823 – 1832
- 97 Lehr HA, Hansen DA, Kussick S et al. Assessment of proliferative activity in breast cancer: MIB-1 immunohistochemistry versus mitotic figure count. *Human Pathology* 1999; 30: 1314 – 1320
- 98 Goodman DG, Maronpot RR, Newberne PM, Popp JA, Squire RA. Proliferative and selected other lesions in the liver of rats, G1-5. In: *Guides for Toxicologic Pathology. STP/ARP/AFIP, Washington, DC. 1994: 1 – 24*
- 99 Roche. *In situ Cell Death Detection Kit, POD. Instruction Manual, 2012*
- 100 Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 1995; 7: 61 – 64
- 101 Kraupp BG, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented dna (tunel assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology* 1995; 21: 1465 – 1468
- 102 Yasuda M, Umemura S, Osamura RY, Kenjo T, Tsutsumi Y. Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method. *Archives of histology and cytology* 1995; 58: 185 – 190
- 103 Stephan H. Einfluß fünf verschiedener nicht-genotoxischer Karzinogene auf das Wachstum spontan entstandener präneoplastischer Herde in der Leber alter Wistar-Ratten. *Dissertation Justus-Liebig-Universität Giessen, 2001*
- 104 Daoust R, Morais R. Degenerative changes, DNA synthesis and mitotic activity in rat liver following single exposure to diethylnitrosamine. *Chemico-Biological Interactions* 1986; 57: 55 – 64
- 105 Kang JS. Expression of epithelial cell adhesion molecule in early phase of hepatocarcinogenesis of mice treated with diethylnitrosamine. *Journal of Biomedical Research* 2012; 13: 243 – 247
- 106 Wiest L. The effect of diethylnitrosamine on the distribution of cell classes in the parenchyma of the liver of newborn rats. *European Journal of Cancer* 1972; 8: 121 – 125
- 107 Laconi S, Curreli F, Diana S et al. Liver regeneration in response to partial hepatectomy in rats treated with retrorsine: a kinetic study. *Journal of Hepatology* 1999; 31: 1069 – 1074

- 108 Pichard V, Couton D, Desdouets C, Ferry N. Polyploidization Without Mitosis Improves In Vivo Liver Transduction With Lentiviral Vectors. *Human Gene Therapy* 2013; 24: 143 – 151
- 109 McQueen CA (Hrsg). *Comprehensive toxicology* Oxford: Elsevier, 2010
- 110 Wanson JC, Bernaert D, May C, Deschuyteneer M, Prieels JP. Isolation and culture of adult rat hepatocytes and preneoplastic nodules from diethylnitrosamine treated livers: glucose-6-phosphatase distribution, albumin synthesis and hepatic binding protein activity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1980; 349: 413 – 415
- 111 Bannasch P, Enzmann H, Klimek F, Weber E, Zerban H. Significance of sequential cellular changes inside and outside foci of altered hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Toxicologic Pathology* 1989; 17: 617 – 628
- 112 Moore MA, Mayer D, Bannasch P. The dose dependence and sequential appearance of putative preneoplastic populations induced in the rat liver by stop experiments with N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* 1982; 3: 1429 – 1436
- 113 Pitot HC. Altered Hepatic FOCI: Their Role in Murine Hepatocarcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1990; 30: 465 – 500
- 114 Barbason H, Rassenfosse C, Betz EH. Promotion mechanism of phenobarbital and partial hepatectomy in DENA hepatocarcinogenesis cell kinetics effect. *British journal of cancer* 1983; 47: 517 – 525
- 115 Rabes HM. Development and growth of early preneoplastic lesions induced in the liver by chemical carcinogens. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1983; 106: 85 – 92
- 116 Rabes HM, Scholze P, Jantsch B. Growth kinetics of diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient "preneoplastic" liver cell populations in vivo and in vitro. *Cancer Research* 1972; 32: 2577 – 2586
- 117 Schulte-Hermann R, Ohde G, Schuppler J, Timmermann-Trosiener I. Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver following treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds, and nafenopin. *Cancer Research* 1981; 41: 2556 – 2562
- 118 Zerban H, Radig S, Kopp-Schneider A, Bannasch P. Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2467 – 2473
- 119 Institute of Laboratory Animal Resources. Histologic typing of liver tumors of the rat. *Journal of the National Cancer Institute* 1980; 64: 177 – 206
- 120 Weber E, Bannasch P. Dose and time dependence of the cellular phenotype in rat hepatic preneoplasia and neoplasia induced by single oral exposures to N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* 1994; 15: 1219 – 1226
- 121 Zerban H, Rabes HM, Bannasch P. Sequential changes in growth kinetics and cellular phenotype during hepatocarcinogenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1989; 115: 329 – 334
- 122 Su Q, Benner A, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules

- of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Archiv* 1997; 431: 391 – 406
- 123 Fernando J, Sancho P, Fernández-Rodríguez CM et al. Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *Journal of cellular physiology* 2012; 227: 1319 – 1325
- 124 European Medicines Agency (EMA). Nexavar: European Public Assessment Reports (EPAR)-Scientific Discussion, 2006
- 125 Gauthier A, Ho M. Role of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology Research* 2013; 43: 147 – 154
- 126 Strumberg D, Clark JW, Awada A et al. Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors. *The oncologist* 2007; 12: 426 – 437
- 127 Coriat R, Nicco C, Chereau C et al. Sorafenib-Induced Hepatocellular Carcinoma Cell Death Depends on Reactive Oxygen Species Production In Vitro and In Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* 2012; 11: 2284 – 2293
- 128 Gao Y, Li H, Xu L et al. Bufalin enhances the anti-proliferative effect of sorafenib on human hepatocellular carcinoma cells through downregulation of ERK. *Molecular Biology Reports* 2012; 39: 1683 – 1689
- 129 Kuckertz M, Patz M, Veldurthy A et al. Comparison of the effects of two kinase inhibitors, sorafenib and dasatinib, on chronic lymphocytic leukemia cells. *Onkologie* 2012; 35: 420 – 426
- 130 Morgillo F, Martinelli E, Troiani T et al. Antitumor Activity of Sorafenib in Human Cancer Cell Lines with Acquired Resistance to EGFR and VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *PLoS ONE* 2011; 6: e28841
- 131 Stewart DJ, Benjamin RS, Luna M et al. Human tissue distribution of platinum after cis-diamminedichloroplatinum. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1982; 10: 51 – 54
- 132 Esposito M, Collecchi P, Oddone M, Meloni S. Platinum assay by neutron activation analysis and atomic absorption spectroscopy in cisplatin treated pregnant mice. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Articles* 1987; 113: 437 – 443
- 133 Fichtinger-Schepman AM, Vendrik CP, van Dijk-Knijnenburg WC et al. Platinum concentrations and DNA adduct levels in tumors and organs of cisplatin-treated LOU/M rats inoculated with cisplatin-sensitive or -resistant immunoglobulin M immunocytoma. *Cancer Research* 1989; 49: 2862 – 2867
- 134 Johnsson A, Olsson C, Nygren O, Nilsson M, Seiving B, Cavallin-Stahl E. Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin in nude mice: platinum levels and cisplatin-DNA adducts. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1995; 37: 23 – 31
- 135 Newman MS, Colbern GT, Working PK, Engbers C, Amantea MA. Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1999; 43: 1 – 7

- 136 Wang S, Mi J, Li Y et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of iv injection of polyphase liposome-encapsulated cisplatin (KM-1) in rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 2003; 24: 589 – 592
- 137 Jensen R, Glazer PM. Cell-interdependent cisplatin killing by Ku/DNA-dependent protein kinase signaling transduced through gap junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 6134 – 6139
- 138 Eichholtz-Wirth H, Hietel B. The relationship between cisplatin sensitivity and drug uptake into mammalian cells in vitro. *British journal of cancer* 1986; 54: 239 – 243
- 139 Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H et al. Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Research* 1987; 47: 414 – 418
- 140 Wang MB, Yip HT, Srivatsan ES. Antisense cyclin D1 enhances sensitivity of head and neck cancer cells to cisplatin. *The Laryngoscope* 2001; 111: 982 – 988
- 141 Keller KA, Aggarwal SK. Embryotoxicity of cisplatin in rats and mice. *Toxicology and applied pharmacology* 1983; 69: 245 – 256
- 142 Ranieri G, Gadaleta-Caldarola G, Goffredo V et al. Sorafenib (BAY 43-9006) in hepatocellular carcinoma patients: from discovery to clinical development. *Current medicinal chemistry* 2012; 19: 938 – 944
- 143 Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics* 2008; 7: 3129 – 3140
- 144 Carr BI, Wang Z, Wang M, Cavallini A, D'Alessandro R, Refolo MG. c-Met-Akt pathway-mediated enhancement of inhibitory c-Raf phosphorylation is involved in vitamin K1 and sorafenib synergy on HCC growth inhibition. *Cancer biology & therapy* 2011; 12: 531 – 538
- 145 Weber A, Boege Y, Reisinger F, Heikenwalder M. Chronic liver inflammation and hepatocellular carcinoma: persistence matters. *Swiss medical weekly* 2011; 141: w13197
- 146 Minicis S de, Marzioni M, Benedetti A, Svegliati-Baroni G. New insights in hepatocellular carcinoma: from bench to bedside. *Annals of Translational Medicine (Online)* 2013; 1
- 147 Fendrich V, Maschuw K, Rehm J et al. Sorafenib Inhibits Tumor Growth and Improves Survival in a Transgenic Mouse Model of Pancreatic Islet Cell Tumors. *The Scientific World Journal* 2012; 2012: 1 – 7
- 148 Afify S. Drug targeting delivery systems for treatment of Raf-1 induced lung tumors in mice. *Dissertation Julius-Maximilians-Universitat Wurzburg*, 2007
- 149 Kramer BW, Gotz R, Rapp UR. Use of mitogenic cascade blockers for treatment of C-Raf induced lung adenoma in vivo: CI-1040 strongly reduces growth and improves lung structure. *BMC Cancer* 2004; 4: 24

- 150 Zhang Q, Sun H, Zhang K et al. Suppression of natural killer cells by sorafenib contributes to prometastatic effects in hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* 2013; 8: e55945
- 151 Lee JI. The effect of sorafenib on hepatic stellate cells: implication of its effect on tumor microenvironment. *The Korean Journal of Hepatology* 2010; 16: 418
- 152 Heindryckx F, Coulon S, Terrie E et al. The placental growth factor as a target against hepatocellular carcinoma in a diethylnitrosamine-induced mouse model. *Journal of Hepatology* 2013; 58: 319 – 328
- 153 Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc. Nexavar®. Fachinformation, 2013. www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/021923s016lbl.pdf, 12.05.2014
- 154 Kudo M, Imanaka K, Chida N et al. Phase III study of sorafenib after transarterial chemoembolisation in Japanese and Korean patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *European Journal of Cancer* 2011; 47: 2117 – 2127
- 155 ClinicalTrials.gov. Sorafenib as Adjuvant Treatment in the Prevention Of Recurrence of Hepatocellular Carcinoma (STORM) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00692770>, 17.12.2013
- 156 Kudo M. Adjuvant Therapy after Curative Treatment for Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 2011; 81: 50 – 55
- 157 Roncalli M, Terracciano L, Di Tommaso L, David E, Colombo M. Liver precancerous lesions and hepatocellular carcinoma: The histology report. *Digestive and Liver Disease* 2011; 43: S361
- 158 Hayes AW. Principles and methods of toxicology. 5. Aufl. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2008
- 159 Wu Y, Zhang K, Yue X et al. Enhancement of tumor cell death by combining cisplatin with an oncolytic adenovirus carrying MDA-7/IL-24. *Acta Pharmacologica Sinica* 2009; 30: 467 – 477
- 160 Guo X, Wang W, Zhou F et al. siRNA-mediated inhibition of hTERT enhances chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. *Cancer biology & therapy* 2008; 7: 1555 – 1560
- 161 Chen P, Hu M, Deng X, Li B. Genistein reinforces the inhibitory effect of Cisplatin on liver cancer recurrence and metastasis after curative hepatectomy. *Asian Pacific journal of cancer prevention* 2013; 14: 759 – 764
- 162 Kasai K. Therapeutic efficacy of transarterial chemo-embolization with a fine-powder formulation of cisplatin for hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology* 2013; 19: 2242 – 2248
- 163 Kudo M. Treatment of Advanced Hepatocellular Carcinoma with Emphasis on Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy and Molecular Targeted Therapy. *Liver Cancer* 2012; 1: 62 – 70
- 164 Bagi CM, Andresen CJ. Models of Hepatocellular Carcinoma and Biomarker Strategy. *Cancers* 2010; 2: 1441 – 1452
- 165 Minicis S de, Kisseleva T, Francis H et al. Liver carcinogenesis: Rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Digestive and Liver Disease* 2013; 45: 450 – 459

-
- 166 Kerbel RS. What is the optimal rodent model for anti-tumor drug testing? *Cancer metastasis reviews* 1998-1999; 17: 301 – 304
- 167 Wagner C, Kästner B, Spicher K, Mayer P, Jaehde U, Enzmann H. Potential Targets for Anticancer-Therapy show different Gene Expression Patterns in HepG2 Cells grown in Culture compared to the same Tumor Cell Line grown as Nodular Tumor. *S3.25 Experimental Oncology* 32, 1-108, 2010;
- 168 Brunstrom B, Lund J. Differences between chick and turkey embryos in sensitivity to 3,3',4,4'-tetrachloro-biphenyl and in concentration/affinity of the hepatic receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Comparative biochemistry and physiology* 1988; 91: 507 – 512
- 169 Grinberg I, Reis A, Ohana A et al. Engraftment of human blood malignancies to the turkey embryo: A robust new in vivo model. *Leukemia Research* 2009; 33: 1417 – 1426
- 170 Ishikawa T. Future perspectives on the treatment of hepatocellular carcinoma with cisplatin. *World Journal of Hepatology* 2009; 1: 8 – 16
- 171 Marin JJG, Castaño B, Martinez-Becerra P, Rosales R, Monte MJ. Chemotherapy in the treatment of primary liver tumours. *Cancer Therapy* 2008; 6: 711 – 728

8 Anhang

8.1 Zusatzmaterial

Tab. 70: Zusammenhang histologischer Parameter und Zellproliferation bzw. Zellverlust innerhalb FAH von DEN+DMSO- und DEN+(1 mg)SF-Lebern. Daten ermittelt aus Versuch DS 1.

Histologischer Parameter	DEN+DMSO					DEN+(1 mg)Sorafenib				
	Median		Anzahl FAH	M	T	Median		Anzahl FAH	M	T
tubuläre Struktur des FAH	0,5	≥ 0,5	15	6,59	8,05	0,5	≥ 0,5	23	9,39	8,02
		< 0,5	14	5,68	7,85		< 0,5	22	8,34	9,21
			Faktor	1,2	1,0			Faktor	1,1	1,1
Pleomorphie innerhalb des FAH	0,8	≥ 0,8	16	6,34	7,47	1,2	≥ 1,2	25	8,94	7,99
		< 0,8	13	5,93	8,54		< 1,2	20	8,79	10,52
			Faktor	1,1	1,1			Faktor	1,0	1,3
atypische Nuklei innerhalb des FAH	1,2	≥ 1,2	19	6,44	7,39	1,5	≥ 1,5	24	9,04	10,10
		< 1,2	10	5,61	8,90		< 1,5	21	8,69	7,99
			Faktor	1,1	1,2			Faktor	1,0	1,3
prominente Nukleoli innerhalb des FAH	0,8	≥ 0,8	19	6,42	7,63	1,1	≥ 1,1	23	8,37	8,17
		< 0,8	10	5,65	8,48		< 1,1	22	9,40	10,09
			Faktor	1,1	1,1			Faktor	1,1	1,2
Kompression des umliegenden Gewebes	0	≥ 0	6	9,93	5,78	0	≥ 0	18	9,76	12,53
		= 0	23	5,17	8,44		= 0	27	8,28	6,84
			Faktor	1,9	1,5			Faktor	1,2	1,8

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, M = Anzahl Mitosen pro 1000 Hepatozyten, T = Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro 1000 Hepatozyten.

Tab. 71: Untere Klassengrenzen für stereologische Analysen unter Anwendung der Berechnungen nach Pugh et al. [71] und Enzmann et al. [74].

FAH-Klasse	Klassen-grenze nach FAH-Fläche [μm^2]	Klassen-grenze nach FAH-Radius [μm]	FAH-Klasse	Klassen-grenze nach FAH-Fläche [μm^2]	Klassen-grenze nach FAH-Radius [μm]
1	12288000	625	6	38400	111
2	6144000	442	7	19200	78
3	3072000	313	8	9600	55
4	1536000	221	9	4800	39
5	76800	156	10	2400	28

FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung

Tab. 72: Stereologische Analyse fokaler hepatozellulärer Veränderungen unter Anwendung der Berechnungen nach Pugh et al. [71].

Kla.	DEN+DMSO			DEN+(0,5 mg)SF			DEN+(1 mg)SF			
	n	N_M	N	n	N_M	N	n	N_M	N	
1	0	0,00	0,00	2	0,10	0,10	5	0,46	0,46	
2	4	0,55	0,55	5	0,46	0,36	24	2,80	2,34	
3	14	2,20	1,65	11	1,66	1,19	48	6,44	3,64	
4	18	2,74	0,54	28	6,35	4,69	76	13,28	6,84	
5	29	7,08	4,33	38	8,85	2,50	108	20,86	7,58	
6	49	15,06	7,99	53	16,26	7,40	152	42,93	22,07	
7	75	30,82	15,76	69	25,77	9,52	190	60,81	17,88	
8	97	56,27	25,45	82	33,90	8,13	223	86,33	25,52	
9	104	49,40	0,00	93	42,06	8,16	231	80,79	0,00	
10	106	47,24	0,00	97	43,42	1,35	231	79,60	0,00	
Gesamtzahl FAH pro cm^3 Leber			56,6				43,3	86,3		

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, Kla. = FAH-Klasse, n = Anzahl zugeordneter FAH-Anschnitte, N_M = Median der Anzahl FAH pro Volumen (cm^3), N = Anzahl der FAH pro Volumen (cm^3).

Tab. 73: Angabe der Konstanten zur Berechnung der Anzahl FAH pro Volumen (cm³) nach Enzmann et al. [74].

C1 = 1,7319	C3 = 0,1669	C5 = 0,0373	C7 = 0,0091	C9 = 0,0023
C2 = 0,4142	C4 = 0,0772	C6 = 0,0183	C8 = 0,0045	C10 = 0,0011

Tab. 74: Einfluss von DEN auf das Gewicht [g] von Putenembryonen in verschiedenen Versuchen.

d0 DEN [mg/Ei]	d7 bzw. d14 Injektion 2	Versuch ^a DEN 1	Versuch ^b DEN 2	Versuch ^c DEN 3	Versuch ^d DEN 4
- (Wasser)	-	47,31	47,86	48,87	46,04
2	-	44,10**	44,34	45,93	42,60
2	2 mg DEN/Ei		40,33**	39,26**	35,87**
6	-			32,73***	34,93**
8	-	34,08***		32,38***	31,13***

d = Versuchstag, Versuch^a = Eier liegend inkubiert, Versuch^b = Eier liegend inkubiert und Injektion 2 an d14, Versuch^c = Eier liegend inkubiert und Injektion 2 an d7, Versuch^d = Eier ab d10 stehend inkubiert und Injektion 2 an d7, DEN = Diethylnitrosamin, Angabe Signifikanzniveau der DEN-Gruppe gegenüber der Wassergruppe (Mann-Whitney-U-Test): * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Tab. 75: Einfluss von DEN auf das absolute und relative Lebergewichtes in verschiedenen Versuchen.

d0 DEN [mg/Ei]	d7 bzw. d14 Injektion 2	Versuch ^a DEN 1		Versuch ^b DEN 2		Versuch ^c DEN 3		Versuch ^d DEN 4	
		L [g]	rL	L [g]	rL	L [g]	rL	L [g]	rL
- (Wasser)	-	0,87	1,84	0,85	1,79	0,82	1,72	0,78	1,69
2	-	0,79**	1,80	0,84	1,90	0,82	1,80	0,67	1,58
2	2 mg DEN/Ei			0,64**	1,59	0,69*	1,76	0,67	1,84
6	-					0,66	2,00	0,47*	1,32
8	-	0,50***	1,44***			0,57***	1,77	0,39***	1,28*

d = Versuchstag, Versuch^a = Eier liegend inkubiert, Versuch^b = Eier liegend inkubiert und Injektion 2 an d14, Versuch^c = Eier liegend inkubiert und Injektion 2 an d7, Versuch^d = Eier ab d10 stehend inkubiert und Injektion 2 an d7, DEN = Diethylnitrosamin, Angabe Signifikanzniveau der DEN-Gruppe gegenüber der Wassergruppe (Mann-Whitney-U-Test): * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Tab. 76: Anzahl BrdU-positive Hepatozyten innerhalb des Lebergewebes von unbehandelten Eiern und des extrafokalen Lebergewebes von DEN-Eiern.

Behandlung der Puteneier ^a	Volumen BrdU-Lösung	Inkubationsdauer BrdU-Lösung	Anzahl gezählter Bilder	MW BrdU-positive Hepatozyten pro Bild
∅	0,5 mL	60 min	12	8,36
∅	0,5 mL	120 min	24	6,71
∅	1 mL	30 min	18	11,44
∅	1 mL	60 min	9	8,11
∅	1 mL	120 min	10	4,70
2 + 2 mg DEN	0,25 mL	120 min	21	36,86
2 + 2 mg DEN	0,5 mL	120 min	12	33,17

a = Nullkontrolle bzw. DEN Versuchstag 0 und d7 je 2 mg/Ei, MW = Mittelwert.

Tab. 77: Stereologische Analyse fokaler hepatozellulärer Veränderungen unter Anwendung der Berechnungen nach Enzmann et al. [74].

Kla.	DEN+DMSO			DEN+(0,5 mg)SF			DEN+(1 mg)SF			
	n	N _n	N _N	n	N _n	N _N	n	N _n	N _N	
1	0	0,00	0,00	2	22,84	0,26	6	68,51	0,88	
2	4	67,13	0,74	3	36,45	0,41	19	277,16	3,55	
3	10	209,67	2,32	6	119,79	1,36	24	406,06	5,20	
4	4	0,00	0,00	17	515,6	5,85	28	642,84	8,23	
5	11	467,36	5,17	10	148,4	1,68	32	1020,93	13,07	
6	20	1091,44	12,08	15	772,6	8,77	44	2174,66	27,84	
7	26	1779,60	19,70	16	969,9	11,01	39	2068,92	26,49	
8	22	1591,83	17,62	14	1038,3	10,17	31	2083,08	26,67	
9	7	0,00	0,00	10	822,6	9,33	8	0,00	0,00	
10	2	0,00	0,00	4	0,0	0,00	0	0,00	0,00	
Gesamtzahl FAH pro cm ³ Leber			57,6				50,5			

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, Kla. = FAH-Klasse, n = Anzahl zugeordneter FAH-Anschnitte, N_M = Median der Anzahl FAH pro Volumen (cm³), N = Anzahl der FAH pro Volumen (cm³).

Tab. 78: Mitosen und TUNEL-positive Zellen in Lebern aus unbehandelten Eiern.

	Anzahl Proben	Mittelwert pro 1000 Zellen	Standardabweichung	untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls
Mitosen	8	1,38	1,49	0,13 – 2,63
TUNEL-positiv	8	0,73	0,32	0,46 – 1,00

Tab. 79: Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in extrafokalem Lebergewebe und in FAH. DEN+DMSO-Gruppe aus Versuch DS 1.

	Mitosen		TUNEL-positiv	
	extrafokal	FAH	extrafokal	FAH
MW	1,80	6,15	1,77	7,95
SD	0,84	3,55	0,51	4,16
KI	1,34 – 2,27	4,80 – 7,51	1,49 – 2,06	6,30 – 9,39
n	15	29	15	27
MW normiert	1,00	3,41	1,00	4,48
KI	0,74 – 1,26	2,67 – 4,16	0,84 – 1,16	3,30 – 5,24

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n extrafokal = Anzahl Embryonen, n FAH = Anzahl FAH, MW normiert = MW in den FAH als Veränderung gegenüber extrafokalem Lebergewebe.

Tab. 80: Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in extrafokalem Lebergewebe, basophilen und eosinophilen FAH. DEN+DMSO-Gruppe aus Versuch DS 1.

		MW	SD	KI	n	MW normiert	KI
		M	EF	1,80	0,84	1,34 – 2,27	15
	BCF	6,33	3,34	4,85 – 7,81	22	3,51	2,69 – 3,93
	ECF	5,61	4,41	1,52 – 9,69	7	3,11	0,85 – 5,37
T	EF	1,77	0,51	1,49 – 2,06	15	1,00	0,84 – 1,16
	BCF	7,98	4,48	5,88 – 10,07	20	4,50	3,32 – 5,68
	ECF	7,87	3,36	4,76 – 10,97	7	4,44	2,68 – 6,19

M = Mitosen, T = TUNEL-positiv, EF = extrafokales Lebergewebe, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderungen, BCF = basophile FAH, ECF = eosinophile FAH, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl (in EF Lebern, sonst FAH), MW normiert = MW in BCF bzw. ECF als Veränderung gegenüber extrafokalem Lebergewebe.

Tab. 81: Anzahl Mitosen und TUNEL-positive Zellen pro 1000 Hepatozyten in extrafokalem Lebergewebe und in nicht komprimierenden und komprimierenden FAH. DEN+DMSO-Gruppe aus Versuch DS 1.

		MW	SD	KI	n	MW normiert	KI
M	EF	1,80	0,84	1,34 – 2,27	15	1,00	0,74 – 1,26
	FAH(nk)	5,17	2,82	3,95 – 6,39	23	2,87	2,19 – 3,55
	FAH(k)	9,93	3,74	6,01 – 13,86	6	5,51	3,33 – 7,69
T	EF	1,77	0,51	1,49 – 2,06	15	1,00	0,84 – 1,16
	FAH(nk)	8,44	4,36	6,51 – 10,37	22	4,76	3,67 – 5,86
	FAH(k)	5,78	2,34	2,88 – 8,69	5	3,26	1,62 – 4,90

M = Mitosen, T = TUNEL-positiv, EF = extrafokales Lebergewebe, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderungen, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, KI = untere und obere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls, n = Anzahl (in EF Lebern, sonst FAH), MW normiert = MW in BCF bzw. ECF als Veränderung gegenüber extrafokalem Lebergewebe.

Tab. 82: Merkmalsausprägung der FAH in Lebern der DEN+DMSO und der DEN+(1 mg)SF-Gruppe des Versuches DS 1.

	DEN+DMSO (MW ± SD)	DEN+(1 mg) SF (MW ± SD)
tubuläre Struktur	0,53 ± 0,46	0,44 ± 0,28
Pleomorphie	1,02 ± 0,59	1,35 ± 0,42
atypische Nuklei	1,29 ± 0,37	1,44 ± 0,33
prominente Nukleoli	0,83 ± 0,27	1,13 ± 0,18
Basophilie	1,16 ± 0,45	1,33 ± 0,57
Eosinophilie	0,26 ± 0,29	0,15 ± 0,24
Kompression des umliegenden Gewebes	0,19 ± 0,52	0,23 ± 0,45

DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Tab. 83: Einfluss von Sorafenib auf das Nettowachstum im extrafokalen Lebergewebe und in FAH – erweiterte Tabelle.

	DEN+DMSO			DEN+(1 mg)SF		
	Anzahl ^a	MW	SD	Anzahl ^a	MW	SD
EF	15	46,47	27,76	10	36,92	19,64
FAH	27	138,27	113,52	45	198,72	170,20
BCF	20	143,21	111,92	41	210,71	172,53
ECF	7	124,18	125,95	4	69,80	74,64
FAH(nk)	22	105,31	84,32	27	193,79	159,60
FAH(k)	5	283,34	118,97	28	206,10	189,53

EF = extrafokales Lebergewebe, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, BCF = basophiler FAH, ECF = eosinophiler FAH, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, a = im EF Anzahl Lebern, sonst Anzahl FAH, DEN = Diethylnitrosamin, DMSO = Dimethylsulfoxid, SF = Sorafenib, MW = Mittelwert Zellen pro 24 h, SD = Standardabweichung.

Tab. 84: Merkmalsausprägung der FAH in Lebern der DEN+NaCl und DEN+CP - Gruppen des Versuches DC 2.

	DEN+NaCl	DEN+ (0,25 mg)CP	DEN+ (0,5 mg)CP	DEN+ (0,1 mg)CP
tubuläre Struktur	0,41 ± 0,40	0,33 ± 0,33	0,27 ± 0,32	0,46 ± 0,58
Pleomorphie	1,32 ± 0,32	1,41 ± 0,41	1,62 ± 0,33	1,57 ± 0,30
atypische Nuklei	1,24 ± 0,32	1,31 ± 0,30	1,56 ± 0,30	1,54 ± 0,27
prominente Nukleoli	1,00 ± 0,13	1,03 ± 0,09	1,13 ± 0,09	1,35 ± 1,63
Basophilie	0,99 ± 0,48	1,02 ± 0,48	0,97 ± 0,42	1,06 ± 0,50
Eosinophilie	0,64 ± 0,34	0,54 ± 0,34	0,63 ± 0,38	0,65 ± 0,37
Kompression des umliegenden Gewebes	0,03 ± 0,11	0,02 ± 0,07	0,00 ± 0,02	0,03 ± 0,10

DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin

Tab. 85: Zusammenhang histologischer Parameter und Zellproliferation bzw. Zellverlust innerhalb FAH von DEN+NaCl- und DEN+(0,25 mg)CP-Lebern. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

Histologischer Parameter	DEN+NaCl					DEN+(0,25 mg)Cisplatin				
	Median		Anzahl FAH	M	T	Median		Anzahl FAH	M	T
tubuläre Struktur des FAH	0,3	≥ 0,3	33 (32)	5,61	6,55	0,2	≥ 0,2	51	6,15	7,58
		< 0,3	30	4,78	3,85		< 0,2	22	4,25	6,50
		Faktor		1,2	1,7		Faktor		1,4	1,2
Pleomorphie innerhalb des FAH	1,3	≥ 1,3	44	5,80	5,51	1,3	≥ 1,3	47	5,81	6,33
		< 1,3	19 (18)	3,87	5,04		< 1,3	26	5,22	8,55
		Faktor		1,5	1,1		Faktor		1,1	1,4
atypische Nuklei innerhalb des FAH	1,3	≥ 1,3	42	5,28	5,70	1,4	≥ 1,4	44	6,10	6,68
		< 1,3	21 (20)	5,10	4,45		< 1,4	29	4,84	7,80
		Faktor		1,0	1,3		Faktor		1,3	1,0
prominente Nukleoli innerhalb des FAH	1	≥ 1,0	53 (52)	5,11	5,58	1,0	≥ 1,0	66	5,76	6,78
		< 1,0	10	5,77	3,86		< 1,0	7	4,07	10,36
		Faktor		1,1	1,4		Faktor		1,4	1,5
Kompression des umliegenden Gewebes	0	≥ 0	12	3,55	2,07	0	≥ 0	5	7,11	4,09
		= 0	51 (50)	5,61	6,08		= 0		5,49	7,34
		Faktor		1,6	2,9		Faktor		1,3	1,8

DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, M = Anzahl Mitosen pro 1000 Hepatozyten, T = Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro 1000 Hepatozyten, in Spalte „Anzahl FAH“: Anzahl FAH für Ermittlung von M und in Klammern Anzahl FAH für Ermittlung von T.

Tab. 86: Zusammenhang histologischer Parameter und Zellproliferation bzw. Zellverlust innerhalb FAH von DEN+(0,5 mg)CP-Lebern und DEN+(1 mg)CP-Lebern. Daten ermittelt aus Versuch DC 2.

Histologischer Parameter	DEN+(0,5 mg)Cisplatin					DEN+(1 mg)Cisplatin				
	Median		Anzahl FAH	M	T	Median		Anzahl FAH	M	T
tubuläre Struktur des FAH	0,1	≥ 0,1	24	6,87	8,11	0,3	≥ 0,3	19 (18)	7,87	8,48
		< 0,1	4	5,51	3,41		< 0,3	16 (15)	6,61	8,85
		Faktor		1,2	2,4		Faktor		1,2	1,0
Pleomorphie innerhalb des FAH	1,7	≥ 1,7	16	7,03	7,79	1,6	≥ 1,6	17 (15)	6,47	9,49
		< 1,7	12	5,69	6,75		< 1,6	18	8,07	7,95
		Faktor		1,2	1,2		Faktor		1,2	1,2
atypische Nuklei innerhalb des FAH	1,6	≥ 1,6	16	7,76	6,56	1,5	≥ 1,5	22 (20)	7,19	8,43
		< 1,6	12	4,75	8,70		< 1,5	13	7,47	8,98
		Faktor		1,6	1,3		Faktor		1,0	1,1
prominente Nukleoli innerhalb des FAH	1,1	≥ 1,1	23	6,91	6,58	1,1	≥ 1,1	19 (17)	6,36	11,17
		< 1,1	5	4,15	11,61		< 1,1	16	8,40	5,97
		Faktor		1,7	1,8		Faktor		1,3	1,9
Kompression des umliegenden Gewebes	0	≥ 0	3	7,65	3,15	0	≥ 0	5	3,43	4,41
		= 0	25	5,86	8,44		= 0	30 (28)	7,94	8,97
		Faktor		1,3	2,7		Faktor		2,3	2,0

DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, M = Anzahl Mitosen pro 1000 Hepatozyten, T = Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro 1000 Hepatozyten, in Spalte „Anzahl FAH“: Anzahl FAH für Ermittlung von M und in Klammern Anzahl FAH für Ermittlung von T.

Tab. 87: Einfluss von Cisplatin auf das Nettowachstum im extrafokalen Lebergewebe und in FAH – erweiterte Tabelle.

G		EF	FAH	BCF	ECF	FAH(nk)	FAH(k)
1	MW	26,76	125,55	112,01	151,56	132,35	97,22
	SD	22,05	137,12	138,01	139,43	146,22	89,11
	n ^a	4	62	45	17	50	12
2	MW	7,62	122,27	144,28	55,04	116,94	194,79
	SD	16,96	151,33	149,36	140,65	145,84	221,14
	n ^a	5	73	55	18	68	5
3	MW	20,47	146,73	159,11	112,08	137,55	219,61
	SD	23,51	194,55	206,64	136,41	199,21	162,26
	n ^a	5	28	23	5	25	3
4	MW	34,51	173,58	217,44	-23,76	191,29	74,41
	SD	29,04	215,08	210,07	97,30	227,33	82,22
	n ^a	5	33	27	6	28	5

G = Gruppe, 1 = DEN+NaCl-Gruppe, 2 = DEN+(0,25 mg)CP, 3 = DEN+(0,5 mg)CP, 4 = DEN+(1 mg)CP, DEN = Diethylnitrosamin, NaCl = Natriumchlorid, CP = Cisplatin, EF = extrafokales Lebergewebe, FAH = fokale hepatozelluläre Veränderung, BCF = basophiler FAH, ECF = eosinophiler FAH, FAH(nk) = nicht komprimierende FAH, FAH(k) = komprimierende FAH, MW = Mittelwert Zellen pro 24 h, SD = Standardabweichung, n = bei EF Anzahl Lebern, sonst Anzahl FAH.

Tab. 88: Überlebensrate von Hühnerembryonen unter Einfluss von DEN.

	Wasser	DEN [mg/Ei]							
		0,2	0,25	0,3	0,4	0,5	1	2,5	5
n	65	30	20	30	30	50	35	15	15
ÜR	64%	77%	20%	80%	67%	29%	0%	0%	0%

n = Anzahl Eier, ÜR = Überlebensrate von Versuchstag 0 bis 18, DEN = Diethylnitrosamin.

8.2 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Harald Enzmann für die Überlassung des interessanten Themas. Er stand mir stets als hilfreicher Diskussionspartner zur Verfügung und hat – nicht zuletzt durch sein von Anfang an mir entgegen gebrachtes Vertrauen und seine aufmunternden und motivierenden Worte zur richtigen Zeit – zum erfolgreichen Gelingen der Arbeit beigetragen. In seiner Obhut habe ich mich immer wohl gefühlt.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde danke ich sehr für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Dr. Karsten Spicher möchte ich mich für die zuverlässige Unterstützung, insbesondere für das gewissenhafte Korrekturlesen der Arbeit bedanken. In theoretischen und praktischen Fragen jedweder Art stand er stets helfend zur Seite

Ein herzlicher Dank gilt meiner Doktorandenkollegin Christina Wagner für die schöne gemeinsame Zeit in Büro, Labor und auch darüber hinaus. Ich vermisse die spannende und Vorfreude auslösende Frage, welche Überraschung die Süßigkeitenschublade bereithält.

Christoph Schlösser danke ich für seine unermüdliche Assistenz bei Versuchsdurchführung und Probenaufarbeitung. Auch Maria Catarinolo danke ich für die Hilfe im Labor, vor allem während der Applikations- und Präpariermarathons.

Dr. Carina Mohn möchte ich für die Durchführung der Platinbestimmung und der Hilfe bei der Auswertung dieser Daten danken.

Weiterhin danke ich Irene Bachmann für die stets freundliche Unterstützung vor allem für ihr Organisationstalent zum Ermöglichen der Diskussionsrunden und ihr offenes Ohr bei allen Belangen.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch meinen Freunden, die mich immer unterstütz haben und auch für die erforderliche Abwechslung und Ablenkung von der Arbeit sorgten.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.