

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Toxikologie:
Kommissarische Leitung Professor Dr. Helga Stopper

***In vitro* Analysen der Wechselwirkung erhöhter
Temperatur mit Zytostatika
am Beispiel von Cisplatin**



Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Carolin Julia Curtaz

aus Estenfeld

Würzburg, November 2018

Referent bzw. Referentin:
Korreferent bzw. Korreferentin:

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper
Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Hackenberg

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.2018

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Ursprung und Metastasierung der Peritonealkarzinose | 1 |
| 1.2 | Epidemiologie der Peritonealkarzinose | 2 |
| 1.3 | Stadieneinteilung der Peritonealkarzinose | 3 |
| 1.4 | Klassische Therapien der Peritonealkarzinose | 4 |
| 1.5 | Neuer Therapieansatz in der Behandlung der Peritonealkarzinose und dessen Vorteile | 5 |
| 1.6 | Die Verwendung von Cisplatin in der Tumorthherapie | 9 |
| 1.7 | Prüfung von Gentoxizität und Veränderung der Zellmorphologie | 13 |
| 1.7.1 | Mikrokerntest | 13 |
| 1.7.2 | Comet-Assay | 14 |
| 1.7.3 | Durchflusszytometrie | 15 |
| 1.7.4 | Vitalitätstest und morphologische Betrachtung im Mikroskop | 17 |
| 1.8 | Zielsetzung | 19 |
| 2 | Material | 20 |
| 2.1 | Geräte | 20 |
| 2.2 | Verbrauchsmaterial | 21 |
| 2.3 | Chemikalien | 21 |
| 2.4 | Medien und Lösungen für die Zellkultur | 23 |
| 2.5 | Pufferlösungen für die einzelnen Methoden | 24 |
| 2.5.1 | Mikrokerntest | 24 |
| 2.5.2 | Comet-Assay | 24 |
| 2.5.3 | Vitalitätstest | 24 |
| 2.5.4 | Durchflusszytometrie | 25 |
| 3 | Methoden | 27 |
| 3.1 | Literaturrecherchen | 27 |
| 3.2 | Zellkultur | 27 |
| 3.2.1 | HT29-Zellen | 27 |
| 3.2.2 | CaCo-2-Zellen | 27 |
| 3.2.3 | HCT116-Zellen | 28 |
| 3.2.4 | HaCat-Zellen | 28 |
| 3.3 | Zellzahlquantifizierung mittels Neubauerkammer und morphologische Auswertung mit Gel Green | 29 |
| 3.4 | Gentoxizitätstests | 29 |
| 3.4.1 | Mikrokerntest | 29 |
| 3.4.2 | Comet-Assay | 31 |
| 3.4.3 | Apoptosedetektion mittels Annexin-V-FLUOS Markierung | 33 |
| 3.4.4 | Quantifizierung von oxidativem Stress mittels Messung des GSH-Gehaltes | 34 |
| 3.4.5 | Quantifizierung des oxidativen Stress' mittels Messung des DCF-Gehalts | 35 |
| 3.5 | Vitalitätstest und morphologische Betrachtung im Mikroskop | 36 |
| 3.5.1 | Vitalitätstest mittels Fluoresceindiacetat (FDA) und Gel Red | 37 |
| 3.6 | Statistik | 37 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4 | Ergebnisse | 39 |
| 4.1 | Vorversuche zur Identifizierung geeigneter Zelllinien für Hitze-Exposition mittels Mikrokerntest | 39 |
| 4.1.1 | HCT116-Zelllinie | 39 |
| 4.1.2 | HaCat-Zelllinie | 40 |
| 4.1.3 | CaCo-2-Zelllinie | 42 |
| 4.1.4 | HT29-Zelllinie | 42 |
| 4.1.5 | Vorversuche mit HCT116, HaCaT, HT29 und CaCo-2 Zellen im Mikrokerntest | 46 |
| 4.2 | Comet-Assay mit Kombination von Hitze und Cisplatin | 46 |
| 4.2.1 | HT29-Zelllinie | 47 |
| 4.2.2 | CaCo-2-Zelllinie | 50 |
| 4.3 | Apoptosedetektion und Nachweis von oxidativem Stress mittels Durchflusszytometrie | 53 |
| 4.3.1 | Apoptosedetektion mittels Annexin-V-FLUOS Markierung | 53 |
| 4.3.2 | Quantifizierung von oxidativem Stress mittels Messung des GSH-Gehaltes | 55 |
| 4.3.3 | Quantifizierung von oxidativem Stress mittels Messung des DCF-Gehalts | 58 |
| 4.4 | Vitalitätstest mittels Fluoresceindiacetat (FDA) und Gel Red | 61 |
| 4.5 | Zellzahlquantifizierung mittels Neubauerkammer und morphologische Auswertung mit Gel Green | 63 |
| 5 | Diskussion | 68 |
| 5.1 | Gentoxizitätstests | 68 |
| 5.1.1 | Auswahl geeigneter Versuchszelllinie basierend auf der Mikrokerninduktion durch Hyperthermie | 68 |
| 5.1.2 | Auswirkungen von Cisplatin auf die Mikrokernfrequenz | 69 |
| 5.1.3 | Untersuchung des Mikrokerninduktionswegs | 70 |
| 5.1.4 | Beeinflussung des Ergebnis durch verschiedene Passagenhöhe | 71 |
| 5.2 | Comet Assay | 72 |
| 5.3 | Durchflusszytometrie | 75 |
| 5.3.1 | Kein Nachweis von gesteigertem oxidativem Stress bei Kombination von Hyperthermie und Cisplatin | 76 |
| 5.3.2 | Wenige Apoptosen bei abgelösten mit Hyperthermie behandelten Zellen | 78 |
| 5.4 | Hohe Vitalität trotz Behandlung mit Hyperthermie und Cisplatin | 80 |
| 5.5 | Detektion von Zellmembranläsionen bei hyperthermisch behandelten Zellen | 82 |
| 5.6 | Induktion einer ‚mitotic catastrophe‘ durch Hyperthermie | 83 |
| 5.7 | Zellzyklusarrest bei Cisplatin-behandelten Zellen | 85 |
| 5.8 | Ausblick | 87 |
| 6 | Zusammenfassung | 88 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 92 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis | 105 |

Abkürzungen:

| | |
|-----------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µM | Mikromolar |
| Abb. | Abbildung |
| BSA | Bovine Serum Albumine |
| BSO | L-Buthionin-sulfoximin |
| bzw. | beziehungsweise |
| CBPI | Cytochalasin-B-Proliferationsindex |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| CRS | cytoreductive surgery |
| CUP | cancer of unknown primary |
| DABCO | 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan |
| DCF | 2',7'-Dichlorofluoreszin |
| DCF-DA | 2',7'-Dichlorofluoreszin-Diacetat |
| DK | doppelkernig |
| Dest. | Destilliert |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethyl Sulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| Dr. | Doktor |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EK | Einkernig |
| et al. | et alii |
| etc. | et cetera |
| FDA | Fluoresceindiacetat |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| g | Gramm |
| GSH | γ-L-Glutamyl-L-cysteinylglycin/Glutathion |
| GSSG | Glutathion-Disulfid |
| h | Stunde |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HIPEC | Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie |

| | |
|----------------|--|
| HMG | High Mobility Group |
| HPLC | High performance liquid chromatographie |
| Hz | Hertz |
| J | Joule |
| kg | Kilogramm |
| konz. | konzentriert |
| l | Liter |
| m | Meter |
| M | Molar |
| m ² | Quadratmeter |
| MCB | Monochlorobimane |
| min | Minute |
| MK | Mehrkernig |
| MK | Mikrokern |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| N ₂ | Stickstoff |
| Na | Natrium |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| OP | Operation |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PC | Peritonealkarzinom |
| PCI | Peritonealkarzinoseindex |
| pH | negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität |
| Prof. | Professor |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute Medium |
| s | Sekunde |
| SEM | Standardfehler |
| t | Zeit |

| | |
|------|--|
| T3N+ | TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms – T3= Tumor infiltriert Subserosa, N+= alle Lymphknoten befallen |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Umdrehung |
| UV | Ultraviolettstrahlung |
| VAS | 1,3-Benzoxazol-2-yl-3-benzyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-yl sulfide |
| V | Volt |

1 Einleitung

1.1 Ursprung und Metastasierung der Peritonealkarzinose

Als Peritonealkarzinose (PC) bezeichnet man den tumorösen, bösartigen Befall des Bauchfells. Erstmals wurde die Entstehung einer Peritonealkarzinose von Sampson 1931 beschrieben, indem er eine Ausbreitung eines vorliegenden Ovarialkarzinoms auf das Peritoneum nachweisen konnte (Sampson 1931). Neben den seltenen primären Neoplasien des Peritoneums, wie zum Beispiel das maligne peritoneale Mesotheliom, sind häufiger übergreifende Tumorentitäten aus den pelvinen Organen (vor allem Ovarialkarzinome) und dem Gastrointestinaltrakt (Magen-, Dünndarm-, Appendix-, Pankreas- und Kolorektalkarzinome) bekannt, welche sich dort als Metastasen ausbreiten. Ursächlich für die Entstehung eines PC können außerdem ein sich ausbreitender Tumor aus einem extraabdominalen Organ (Melanome, Mammakarzinome) oder auch ein CUP-Syndrom („cancer of unknown primary“) (Siewert 2010) sein.

Die Ausbreitung des Tumors kann *per continuitatem* (bei intraperitonealen Organen), durch Tumorzellverschleppung während der Primärtumorresektion oder durch lymphogene oder hämatogene Metastasierung erfolgen (Siewert 2010). Wie die genaue Pathogenese der Metastasierung jedoch abläuft, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine lokoregionale Metastasierung (Cavaliere et al. 2000) mit spontaner Streuung vor allem bei Kapselverletzung des Primärtumors (Piso et Arnold 2011) in das Peritoneum scheint wahrscheinlich. Eine potentielle Pathogenese der Tumorentstehung und -ausbreitung teilt sich dabei nach Ceelen und Bracke in folgende Schritte auf: Zellablösung vom Primärtumor, Zelladhäsion an Mesothelzellen oder Endothelzellen, Apoptoseinduktion des Mesothels und der Basalmembran, Invasion in die extrazelluläre Matrix; Degradation und Infiltration mit Bildung von neuem Tumorgewebe im Stroma (Ceelen et Bracke 2009) (siehe Abb. 1).

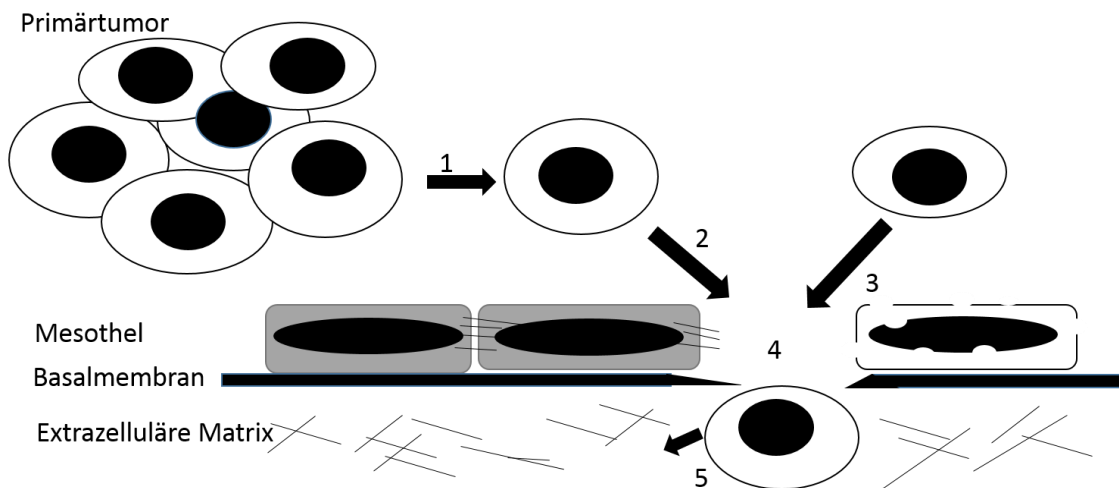


Abbildung 1: Pathogenese der Peritonealkarzinose; 1 Zellablösung, 2 Zelladhäsion, 3 Apoptoseinduktion, 4 Invasion, 5 Degradation und Invasion (nach Ceelen et Bracke 2009)

Der genaue Pathomechanismus der Tumorausbreitung ist für die klinische Therapie von großer Wichtigkeit, da bei circa jedem zehnten Patienten bereits bei Erstdiagnose eines kolorektalen Karzinoms eine gleichzeitige Peritonealkarzinose festgestellt werden kann. Bei Patienten mit Rektumkarzinom sind es sogar 25 % bei Erstentdeckung (Sugarbaker 2014).

1.2 Epidemiologie der Peritonealkarzinose

Das Auftreten einer Peritonealkarzinose wird in Deutschland auf circa 200 000 Fälle pro Jahr geschätzt, dies entspricht etwa 4,2 % aller in Deutschland auftretenden Krebsneuerkrankungen. Die Ergebnisse der Evocape-1-Studie zeigen, dass bei Auftreten einer Peritonealkarzinose die mediane Gesamtüberlebenszeit bei 5,2 Monaten bei kolorektalem Karzinom und 3,2 Monaten bei Magenkarzinomen lag (Sadeghi et al. 2000).

Die folgende Tabelle (Tab. 1) zeigt die Inzidenz der Peritonealkarzinose bei verschiedenen Tumorentitäten nach Piso und Arnold (Piso et Arnold 2011):

Tabelle 1: *Inzidenz einer Peritonealkarzinose bei verschiedenen Tumorentitäten nach Piso et al. (2011)*

| Tumorentität | Inzidenz |
|--|---|
| Kolorektales Karzinom | 15-20 % isoliert 20-30 % mit anderen Lokalisationen z. B. Leber |
| Magenkarzinom | 10-20 % bei Erstdiagnose 30-40 % für T3N+ Primärtumor 40-50 % beim Rezidiv |
| Ovarialkarzinom | 60-80 % bei Erstdiagnose 55-75 % beim Rezidiv |
| Pankreaskarzinom, cholangiozelluläres Karzinom | 5-10 % |
| CUP-Syndrom, Mammakarzinom, Nierenzellkarzinom, retroperitoneale Sarkome | < 5 % |

1.3 Stadieneinteilung der Peritonealkarzinose

Um das genaue Ausmaß der Peritonealkarzinose festzulegen, etablierten 1994 Gilly et al. eine Stadieneinteilung, basierend auf der Größe und Verteilung der Tumormasse (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: *Stadieneinteilung der Peritonealkarzinose nach Gilly et al. (1994)*

| Stadieneinteilung | Beschreibung des PC |
|-------------------|--|
| 0 | Makroskopisch nicht sichtbar |
| I | < 5 mm, in einem Quadrant des Abdomens |
| II | < 5 mm, diffus |
| III | 0,5 – 2 cm |
| IV | > 2 cm, große Tumorplatte |

Die 1995 veröffentlichte Stadieneinteilung nach Sugarbaker (Sugarbaker et Jablonski 1995), als Peritonealkarzinoseindex (PCI) bekannt, beschreibt die Tumorausbreitung mit Hilfe der Einteilung des Abdomens in neun Regionen und zusätzlich des Dünndarms in eine weitere Region mit vier Abschnitten. Pro Region können bis maximal drei Punkte vergeben werden, es kann also insgesamt eine Gesamtpunktzahl von höchstens 30 erreicht werden (siehe Abb. 2).

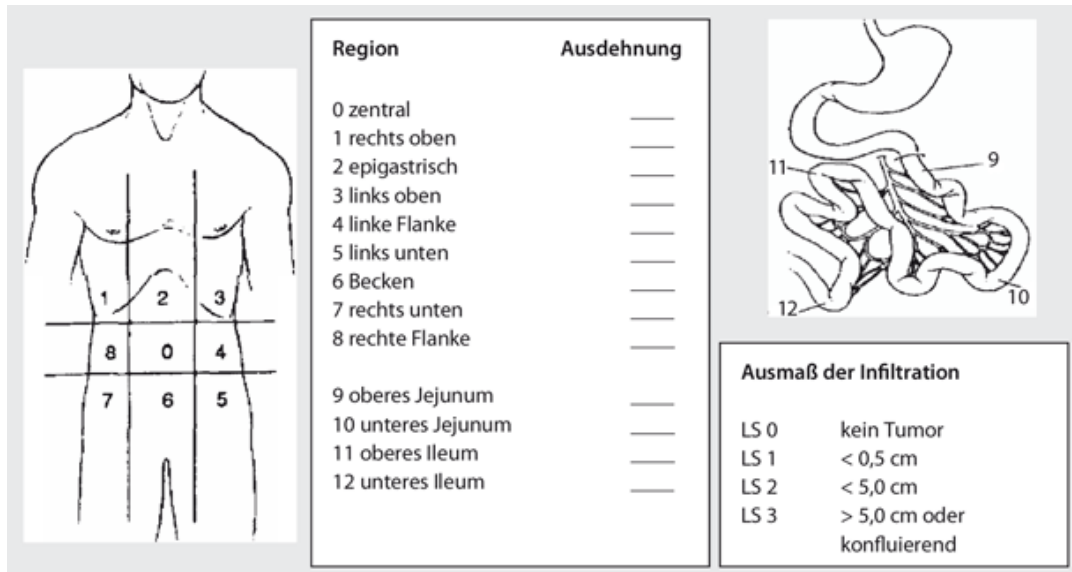


Abbildung 2: Stadieneinteilung der Peritonealkarzinose nach Sugarbaker (Sugarbaker et Jablonski 1995)

Neben der PCI-Klassifizierung werden heute auch noch viele andere „Scores“ in der klinischen Praxis verwendet. Beispiele für die Einteilung bei Tumorentitäten des gastrointestinalen Trakts sind der in Tabelle 2 aufgeführte „Gilly Score“, der „Japanese Gastric Cancer Score“ und unter anderem auch der „simplified peritoneal cancer score“ (SPCI) (Harmon et Sugarbaker 2005). Dabei spielt der PCI von Sugarbaker auch bei malignen Tumoren der pelvinen Organe eine überaus wichtige Rolle in Bezug auf Prognose und Resektabilität und wird somit auch heutzutage bevorzugt in der klinischen Anwendung gebraucht (Harmon et Sugarbaker 2005; Tentes et al. 2003).

1.4 Klassische Therapien der Peritonealkarzinose

Wie die meisten Tumorarten wurde auch die Peritonealkarzinose lange Zeit durch eine systemische Chemotherapie behandelt (Folprecht et al. 2007). Auch konnte die Prognose durch Etablierung von Polychemotherapie und spezifischen Zytostatika weiter verbessert werden, diese stellten jedoch noch immer mit einer medianen Überlebensrate von nur 24 Monaten bei Polychemotherapie ein nicht zufriedenstellendes Ergebnis dar (Elias et al. 2009).

Bereits 1988 entwickelte Sugarbaker eine zytoreduktive, chirurgische Operationstechnik die zur besseren Elimination des Tumors führen sollte. Dabei verwendete er einen mit Hochspannung betriebene Elektrokauter und eine CO₂-Laserverdunstung (Sugarbaker 1988). 1995 publizierte Sugarbaker weitere chirurgische Eingriffsmethoden der viszeralen und parietalen Peritonektomie, die in Abhängigkeit vom Befallsmuster angewendet werden können (Sugarbaker 1995).

Trotz der fortschreitenden chirurgischen Techniken und Polychemotherapie galt jedoch lange Zeit die Peritonealkarzinose als palliativmedizinische Erkrankung mit sehr schlechter Prognose (Cunliffe et Sugarbaker 1989; Jayne et al. 2002; Chu et al. 1989).

1.5 Neuer Therapieansatz in der Behandlung der Peritonealkarzinose und dessen Vorteile

Diese palliativmedizinische Einschätzung der Erkrankung änderte sich erstmalig durch eine Publikation von J. Sugarbaker (1989), in der er ein neues Therapiekonzept mit wesentlich besserem Endergebnis postulierte. Dabei verwendete er eine Kombination aus Peritonektomie mit zytoreduktiver Resektion (CRS) und anschließender perioperativer hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie (HIPEC). Diese Verknüpfung beider Methoden stellte zum ersten Mal einen kurativen Ansatz der Peritonealkarzinose dar (Sugarbaker et al. 1989).

Die Idee der Verwendung von Hyperthermie während der Operation von malignen Tumoren wurde bereits 1977 von Larkin klinisch angewandt. Dabei erhöhte er die Gesamttemperatur des Patienten intraoperativ auf 42 °C im Sinne einer systemischen Thermotheapie (Larkin et al. 1977). Die heutzutage verwendete HIPEC-Therapie hingegen stellt in diesem Sinne eine Weiterentwicklung zur regionalen Hyperthermiebehandlung dar. Seit den 90er Jahren werden auch zunehmend die genauen *in-vitro*-Wirkprinzipien der Hyperthermie auf humane Zellen untersucht (Armour et al. 1993).

Erfahrungen, die man durch die Peritonealdialyse gesammelt hatte, wiesen darauf hin, dass die peritoneale Permeabilität gegenüber hydrophiler Chemotherapeutika wesentlich geringer war als die der Plasma-Clearance. Die Konzentration der Chemotherapeutika, welche direkt in den Bauchraum appliziert wurden, war somit viel höher als bei einer systemischen Applikation. Die Wirkung der stärkeren Konzentration auf malignes Tumorgewebe im Bauchraum stellt somit einen Vorteil in der Therapie von Patienten mit Peritonealkarzinom dar (Dedrick et al. 1978).

Die heutzutage verwendete Hyperthermietechnik wurde erstmalig 1980, nach Entwicklung eines sogenannten thermischen Infusionsystems, zur cavitären Lavage verwendet (Spratt et al. 1980).

Die oben beschriebenen Ideen der Hyperthermie unter Verwendung von Chemotherapeutika in Kombination mit der von ihm schon länger durchgeführten zytoreduktiven Resektion kombinierte Sugarbaker zu einem neuen Therapiekonzept. Er erklärte seinen neuen Therapieansatz durch die Annahme, dass während der Resektion des Primärtumors intraoperativ maligne Tumorzellen im Operationsgebiet und auf der Peritonealoberfläche ungewollt verbreitet werden und sich damit weiter ausbreiten können (Sugarbaker 1996). Eine direkte lokale Chemotherapie im Peritonealraum, als Teil der gastrointestinalen Operation, bietet einen zytotoxisch relevanten Effekt, der den natürlichen Verlauf des Tumors verändern kann (Cunliffe et Sugarbaker 1989; Sugarbaker 1989; Sugarbaker et al. 1989). Seither konnte dieses neue Therapiekonzept in klinischen Studien beweisen, dass es sehr wirksam ist und zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit führt (Yan et al. 2006; Verwaal et al. 2003).

Die zytoreduktive Resektion wird verwendet um den Primärtumor und auch die Metastasen möglichst vollständig zu entfernen. Dabei wird das Ausmaß der Peritonektomie meist intraoperativ von der vorgefundenen Tumorausssaat abhängig gemacht (Kusamura et al. 2008).

HIPEC kann geschlossen oder offen im Abdomen durchgeführt werden. Die Zieltemperatur liegt bei 42 °C, die Perfusionsdauer kann je nach Anwendungsprotokoll zwischen 30 und 120 min liegen. Der Vorteil des offenen HIPEC besteht darin, dass eine Sicherstellung der konstanten intraperitonealen Zirkulation einfach möglich ist, während bei der geschlossenen Operationstechnik eine geringere Kontaminationsgefahr für das behandelnde Personal herrscht (Caneparo et al. 2014; Mussa 2010; González-Moreno 2007).

Die Verwendung des neuen Therapieansatzes bei der Behandlung der Peritonealkarzinose bietet gegenüber der klassischen intravenösen Chemotherapie einige wesentliche Vorteile.

Die lokale Applikation des Chemotherapeutikums erlaubt es höhere Konzentrationen des Medikamentes einzusetzen und führt zu einem räumlich begrenzten höheren Wirkstoffspiegel in dem zu behandelnden Zielgewebe (Krastev et al. 2013; Hasovits et Clarke 2012). Es werden lokale Konzentrationen der verschiedenen Chemotherapeutika um das 8-1000-fache erhöht beschrieben (Speeten et al. 2009; Sugarbaker et al. 2005). Dabei spielen das Molekulargewicht der Reagenzien und die Löslichkeit in der Spüllösung eine entscheidene Rolle bei der Wirksamkeit (Sugarbaker et al. 2005).

Durch die lokale Wirkung des Medikaments wird nur ein geringer Anteil systemisch im Körper aufgenommen, wodurch das Nebenwirkungsprofil geringer ausfällt (González-Moreno et al. 2010; Ceelen et al. 2000). Zusätzlich weisen Tumorzellen häufig eine Hitzesensibilität auf (Rossi Fanelli et al. 1977; Mondovì et al. 1968; Cavaliere et al. 1967). Verantwortlich dafür macht man die Veränderung der Mikroumgebung mit niedrigem pH-Wert, niedrigem Sauerstoff- und Glukosegehalt und dem Verlust einer adaptierten Vasodilatation der Tumorzellen (Ceelen et al. 2000; Hahn 1982). Auch nimmt die Membranfluidität der malignen Zellen ab, was die Aufnahme von Chemotherapeutika erleichtert (Hahn 1979). Die lokale Anwendung von Hyperthermie nutzt diese Effekte sehr gut aus und zeigt in Studien daher einen eigenen temperaturbedingten zusätzlichen zytotoxischen Effekt (Ceelen et Flessner 2010; Sugarbaker et al. 2005).

Die genaue Verwendung der Methodenkombination wird dabei in der Literatur kontrovers diskutiert. Etliche Leitlinien und Anwendungsanleitungen wurden von Experten aufgestellt und verglichen (Dube et al. 2015; Turaga et al. 2014; Kuijpers et al. 2013; Piso et Arnold 2011, González-Moreno et al. 2010, 2010; Rampone et al. 2010; Esquivel 2009; Glehen et al. 2008).

Verschiedenste Chemotherapeutika werden bei der Durchführung der HIPEC-Therapie verwendet. In der folgenden Tabelle (siehe Tabelle 3) wird ein Überblick über die pharmakologischen Charakteristika und Daten von verwendeten Zytostatika der HIPEC-Therapie dargestellt:

Tabelle 3: Pharmakologische Charakteristika und Daten von Zytostatika, die intraperitoneal beim kolorektalen Karzinom mit Peritonealkarzinose eingesetzt werden (modifiziert nach Piso et Arnold 2011, Ceelen et Bracke 2009)

| Zytostatikum | Dosierung intraperitoneal (mg/m ²) | Kombination mit i.v. 5-FU-Gabe | Penetrationstiefe (mm) | Synergie mit Hyperthermie |
|--------------|--|--------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Oxaliplatin | 200-460 | möglich | 1-2 | vorhanden |
| Cisplatin | 50-250 | nicht geprüft | 1-3 | vorhanden |
| Mitomycin C | 20-35 | möglich | 2 | vorhanden |
| 5-FU | 400-650 | entfällt | 0,2 | nicht vorhanden |

Zusätzlich wird in der Literatur ein perioperatives Chemotherapieschema adjuvant oder neoadjuvant diskutiert und empfohlen, womit die Prognose der Patienten verbessert werden soll (Piso et Arnold 2011; Elias et al. 2010; Glehen et al. 2004).

Die publizierten Letalitäts- und Mortalitätsdaten nach zytoreduktiver Resektion und HIPEC sind ähnlich der bei anderen großen chirurgischen Operationen und liegen zwischen 0 % und 7 % (Chua et al. 2009). Generell wird jedoch die Meinung vertreten, dass diese spezifische Operation nur in medizinischen Zentren mit hoher Fallzahl und Expertise durchgeführt werden sollte (Brücher et al. 2012; Moradi et Esquivel 2009).

Generell wird eine Therapie mit HIPEC und CRS nach aktueller Studienlage meist gut toleriert und eine Lebensqualität wie vor Therapiebeginn wird meist nach circa drei Monaten postoperativ erreicht (Seretis et Youssef 2014; McQuellon et al. 2001).

1.6 Die Verwendung von Cisplatin in der Tumorthherapie

Cisplatin ($\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$) ist in vielen Tumortherapieschemas ein Goldstandard in der Behandlung mit Chemotherapie. In den 40er und 50er Jahren versuchten Forscher vermehrt Substanzen zu finden, welche gegen Tumorerkrankungen wirken (Wiltshaw 1979). Erstmals gelang es Rosenberg und VanCamp 1969 die krebshemmenden Wirkung von platinhaltigen Substanzen nachzuweisen (Rosenberg et al. 1969; Rosenberg et al. 1965). Zuvor hatte Rosenberg bereits 1965 erkannt, dass durch die Anwendung von Cisplatin der Zellzyklus, und auch die Morphologie der Mitose verändert und dadurch die Zellteilung gehemmt wird (Rosenberg et al. 1965). Diese Entdeckung veranlasste Rosenberg zu der Annahme, dass Cisplatin eine antikanzerogene Wirkung haben könne, was sich im Lauf seiner Forschungen bestätigte (Alderden et al. 2006; Rosenberg et al. 1969; Rosenberg et al. 1967). Viele weitere Platinverbindungen wurden untersucht, unter anderem Carboplatin ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$) und Oxaliplatin ($\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$), welche auch heutzutage in der Klinik verwendet werden (Rosenberg 1971; Siddik 2003; Florea et Büsselberg 2011).

Cisplatin wurde erstmalig 1844 durch den Italiener Michele Peyrone synthetisiert (Kauffman et al. 2010; Peyrone 1844), wobei lange über die chemische Struktur diskutiert wurde. Diese Struktur spielte dann auch später in der Arbeit des Schweizer Alfred Werner eine maßgebliche Rolle. Werner bekam für seine Arbeit über den Isomerismus in anorganischen Strukturen 1913 den Nobelpreis verliehen (Werner 1893).

Die ersten klinischen Studien über die Wirkung von Cisplatin bei acht Patienten mit vorher nichttherapierbarer Tumorerkrankung wurden 1974 veröffentlicht (Connors et Roberts 1974). Toxische Eigenschaften von Cisplatin waren bereits zuvor in Tierversuchen bei Mäusen und Affen festgestellt worden (Wiltshaw 1979; Rosenberg 1971).

Bereits frühzeitig wurde nach der Ursache des antikanzerogenen Mechanismus von Cisplatin geforscht und eine Interaktion mit der DNA und ihrer Synthese wurde vermutet (Munchausen 1974; Shooter et al. 1972; Howle et Gale 1970). Die DNA als Hauptwirkungsort von Cisplatin steht heutzutage außer Zweifel (Siddik 2003; Roberts et PERA 1983), wobei auch weiterhin der genaue biochemische Reaktionsmechanismus und dessen Beeinflussung durch den entstandenen DNA-Schaden und die zellulären Effekte auf die DNA-Synthese, RNA-Transkription, Zellzyklus oder auch Apoptose-Entstehung nicht gänzlich geklärt sind (Siddik 2003).

Cisplatin gelangt durch passive Diffusion in die Zelle (Gately et Howell 1993) oder nach neuerer Erkenntnis auch durch aktive Aufnahme; zum Beispiel durch die Kupfer-transportierenden Proteinkanäle Ctr1 bzw. Ctr2 oder auch den organischen Kationentransporter OCT2 (Ciarimboli 2014; Ishida et al. 2002). Die Aktivierung erfolgt auf Grund einer Interaktion mit Chlorid, welches sich in der Zelle befindet (Alderden et al. 2006).

Im Zellkern bindet Cisplatin vorwiegend an die DNA-Basen Guanin und Adenin (Raber et al. 2005; Gao et al. 1993; Husain et al. 1985), wodurch es zu Intrastrang- und Interstrang-Querverbindungen innerhalb der DNA kommt (Fuertes et al. 2003; Yang 1999; Yang et Wang 1996). Diese sogenannten Cross-Links verhindern die Replikation und oder auch die Transkription der Geninformation, und bilden zusätzlich noch Nebenprodukte, welche einen zytotoxischen Effekt auf die Zelle haben (Fuertes et al. 2003; Payet et al. 1993). Die dabei entstehende Distorsion der DNA-Helix führt dazu, dass dies von einigen DNA-bindenden Proteinen, wie zum Beispiel den HMG-Proteinen (Barreiro-Alonso et al. 2016; McA'Nulty et Lippard 1996) erkannt wird. Diese wiederum initiieren entweder die Aktivierung der Reparatur oder die Einleitung eines programmierten Zelltods, der Apoptose (Cashin et al. 2013; Galluzzi et al. 2012; Alderden et al. 2006; Fuertes et al. 2003; Zijian Guo, Peter J. Sadler 2000).

Die teilweise gravierenden Nebenwirkungen, vor allem die häufig auftretende Nephrotoxizität, Ototoxizität aber auch Neurotoxizität von Cisplatin (Ciarimboli 2014; Weiss et Poster 1982) wurden bereits in den ersten klinischen Studien des Zytostatikums beobachtet und werden heutzutage mit dessen vermehrter Aufnahme durch spezifische Transporter in bestimmte Zellen in Verbindung gebracht (Ciarimboli 2014).

Wie bei vielen in der Klinik verwendeten Zytostatika kommt es auch bei Cisplatin immer wieder zu Resistenzbildung, was dazu führt, dass die malignen Tumorgewebe bei Gabe des Medikaments nicht mehr in die Apoptose gehen und sich ungehindert weiter ausbreiten (Galluzzi et al. 2012). Es gibt mehrere Wege wie die Tumorzelle eine Resistenz gegenüber Cisplatin ausbilden kann. Bevor Cisplatin in die Zelle gelangen kann und im Zytoplasma oder an der DNA seine Wirkung entfaltet, können bereits die Transportproteine bei der Aufnahme durch die Zellmembran ihre Eigenschaften verändern. Beispiele hierfür sind der Transporter Ctr1, dessen Expression und somit auch Transportaktivität herunterreguliert werden kann (Holzer et Howell 2006). Auch andere Transporter, welche bei Exposition mit Cisplatin dieses vermehrt aus der Zelle heraustransportieren können oder deren Expression in der Zelle verändert wird, spielen in der Resistenzbildung eine Rolle (Galluzzi et al. 2012). Dabei kommt es zum einen zu einer geringeren Akkumulation des Cisplatins in der Zelle, zum anderen zu dessen höheren Verwertung durch sogenannte zytoplasmatische Recyclingmoleküle wie zum Beispiel GSH (Galluzzi et al. 2012; Fuertes et al. 2003). Beim Auftreten von Intra- oder Interstrangbrüchen in der DNA sind resistente Tumorzellen häufig zudem in der Lage, diese zu erkennen und zu reparieren oder sogar diese Veränderung ohne Schaden zu tolerieren (Galluzzi et al. 2012). Eine Apoptoseinduktion wird somit vermieden (Siddik 2003). Dabei ist davon auszugehen, dass die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Cisplatin sich auf vielen Ebenen der Tumorzelle abspielt und diese Faktoren in der Widerstandsfähigkeit gegen die Wirkung des Zytostatikums zusammenwirken (Richon et al. 1987).

1.7 Prüfung von Genotoxizität und Veränderung der Zellmorphologie

1.7.1 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest ist ein Verfahren um DNA-Schäden zu detektieren und eine etablierte Methode bei der Prüfung von Genotoxizität (OECD 2010; Stopper et Müller 1997). Erstmals beschrieben und entwickelt wurde er 1970 von Boller und Schmid (Boller et Schmid 1970). Durch die Zugabe von Cytokalsin B (Fenech et Morley 1985), wurde die Methode noch verbessert. Der Mikrokerntest wird zur Quantifizierung kleiner nukleärer Strukturen, den sogenannten Mikrokerneln, nukleoplasmatischen Brücken und auch andere Anomalien verwendet (Fenech 2006). Mikrokerne entstehen hauptsächlich aus azentrischen chromosomalen Fragmenten oder ganzen Chromosomen, welche es nicht erreichen in die Hauptkerne der Tochterzellen nach der Mitose integriert zu werden (Abbildung 3, Abbildung 4).

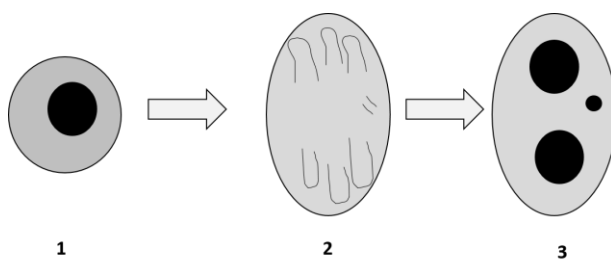


Abbildung 3: Schematische Darstellung Mikrokernebildung: 1 Zelle mit schwarzem Zellkern in der Mitte, 2 Zelle in der Mitose, 3 geteilte Zellkerne mit kleinem schwarzem Mikrokerneln

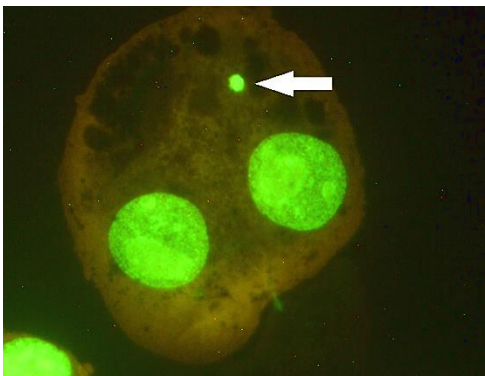


Abbildung 4: Darstellung eines Mikrokerneln in der mittigen Zelle -nach Zellteilung entstandene Zelle mit 2 Zellkernen und weiterem DNA-haltigen Fragment (→) Mikrokerneln

Der Mikrokerntest ist eine etablierte Technik zur Untersuchung vieler Endpunkte der Ökotoxikologie, aber auch zunehmend der Tumorthherapie. Dabei ist es von höchstem Interesse, die Auswirkungen von bestimmten Therapieschemas auf die malignen Zellen zu untersuchen und somit den Nutzen der Therapie zu evaluieren. Der Mikrokerntest wurde zudem bereits im Bereich der Hyperthermieforschung (Hintzsche et al. 2012b; Asanami et Shimono 1997; Stopper et Müller 1997), als auch zur Untersuchung von Cisplatin und seiner Genotoxizität angewandt (Gebel et al. 1997, Kliesch et Adler 1987).

1.7.2 Comet-Assay

Der Comet-Assay (auch bekannt als Einzelzellgelelektrophorese) ist eine etablierte und standardisierte Methode um DNA-Schaden auf dem Niveau von einzelnen eukaryotischen Zellen zu detektieren. Er wurde erstmalig von Ostling und Johanson 1984 (Ostling et Johanson 1984) beschrieben und wird seit 1988 in einer leicht abgeänderten Form (Singh et al. 1988) verwendet. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll entspricht der von Tice et al. (Tice et al. 2000) beschriebenen Methode des alkalischen Comet Assays, welches in Anlehnung nach Olive und Banath (Olive et Banath 2009) angepasst wurde. Es wurde außerdem eine Behandlungspause zwischen Schadensinduktion und Zellernte eingehalten und der Comet-Assay wurde vier Stunden nach der Schadensexposition durchgeführt.

Einzel- oder auch Doppelstrangbrüche und sogenannte alkalilabile Stellen können durch den Comet-Assay quantifiziert werden (Olive et Banáth 2006). Nach Behandlung der Zellen werden diese in einer Agarose-Suspension auf einen Objektträger aufgetragen und lysiert. Somit bleibt nur der Zellkern für die weitere Untersuchung auf dem Objektträger. Im Anschluss wird eine Elektrophorese durchgeführt. DNA-Fragmente, welche durch intrazelluläre Strangbrüche entstanden sind, wandern wegen ihrer geringeren Größe im elektrischen Feld schneller als der Hauptkern. Dieses Prinzip erzeugt im Mikroskop dadurch das charakteristische Bild eines Kometen. Der Kometenkopf wird dabei durch die noch mehrheitlich intakten DNA-Moleküle dargestellt, während die Fragmente den Kometenschweif abbilden. Neben dem Mikrokerntest ist der Comet-Assay eine häufig angewendete Methode zur Untersuchung der Genotoxizität (Fairbairn et al. 1995b).

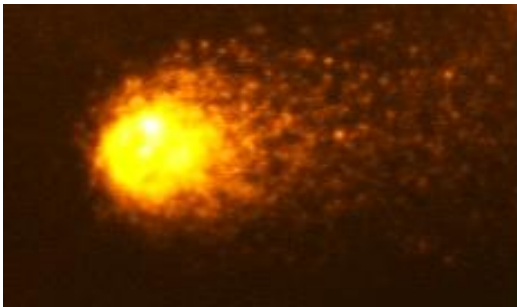


Abbildung 5: Darstellung einer Zelle im Comet-Assay

1.7.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, welches zur vielfältigen Analyse von Zelleigenschaften eingesetzt wird. Diese Methode ist ein optisches Messverfahren, welches Streulicht- und Fluoreszenzsignale von Partikeln bzw. Zellen verwendet, um bestimmte Eigenschaften der Zellen zu detektieren und auszuwerten. Dabei kommt es gleichzeitig zu einer Messung von physikalischen und biochemischen Parametern wie z.B. Größe, Oberfläche, Granularität und bestimmten vorher markierten Proteinen.

In dieser Arbeit sollten die behandelten Zellen nun nach standardisierter Behandlung auf Apoptoseparameter und oxidativen Stress mittels Durchflusszytometer untersucht werden.

Der Nachweis mittels Annexin-V-FLUOS Färbung ist eine weit verbreitete Methode, um Zellen nach *in-vitro*-Behandlung auf Apoptose und Nekrose zu untersuchen (van Engeland et al. 1998; van Engeland et al. 1996; Vermes et al. 1995). Die Behandlung von Tumorzellen mit Zytostatika bezweckt die Induktion des Zelluntergangs. Abbildung 6 (Abbildung 6) stellt exemplarisch das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Analyse von Zellen mit Annexin-V-FLUOS Markierung dar. Auf Grund der Verteilung über die Quadranten der Auftragung kann auf den Zustand der Zellen rückgeschlossen werden.

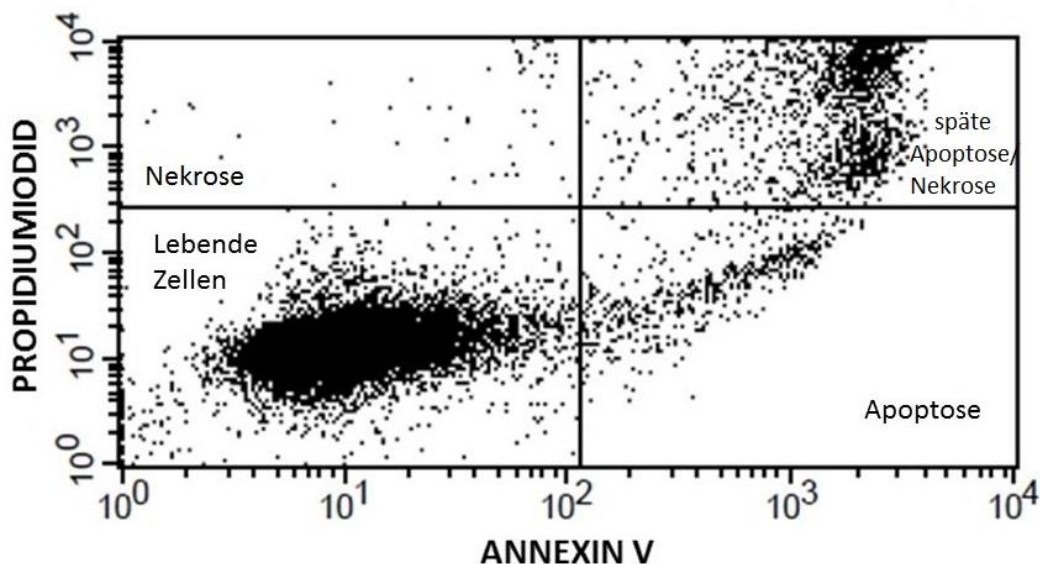


Abbildung 6: Apoptosedetektion mittels Annexin-V-FLUOS Markierung

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann auch der oxidative Stress bestimmt werden. Unter dem Begriff „oxidativer Stress“ versteht man eine Stoffwechsellage der Zelle, die durch eine hohe Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies gekennzeichnet ist. Reaktive Sauerstoffspezies können zahlreiche Zellstrukturen schädigen, da vor allem die freien Radikale danach streben, ihre Elektronenlücke aufzufüllen. Dabei können sie Zellmembranen, Proteine, Enzyme und sogar das Erbgut schädigen und sind am Alterungsprozess beteiligt. Oxidativer Stress kann durch eine Tumorthherapie ebenfalls vermehrt entstehen und einen Zelluntergang der Tumorzelle induzieren (Ozben 2007). Daher kann der durch die Durchflusszytometrie detektierte oxidative Stress einen Indikator für die Wirksamkeit einer Therapie darstellen. Zur Messung können mehrere Verfahren angewendet werden. Reaktive Sauerstoffspezies reagieren mit dem Farbstoff DCF-DH, der zum grün fluoreszierenden DCF oxidiert wird. Dieses kann durchflusszytometrisch quantifiziert werden (Keston et Brandt 1965) .

Eine andere Möglichkeit oxidativen Stress zu detektieren ist mittels Messung des Moleküls Glutathion. Glutathion ist ein Antioxidans, welches bei intrazellulärem oxidativem Stress vermehrt abgebaut wird. Der Glutathionspiegel kann mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Monochlorobiman durchflusszytometrisch detektiert werden (Rice et al. 1986).

1.7.4 Vitalitätstest und morphologische Betrachtung im Mikroskop

Der Vitalitätstest mittels der Farbstoffe FDA/Gel Red oder auch mit Trypanblau dient zur Unterscheidung von vitalen und nicht-vitalen Zellen. Diese schnell durchführbaren Färbeverfahren helfen daher dabei, den Effekt der Testsubstanzen zu untersuchen.

Bei der Untersuchung mit FDA/ Gel Red macht man sich die Aktivität der Esterasen in vitalen Zellen zu nutze, welche FDA spalten und dadurch den grün-fluoreszenten Farbstoff Fluorescein intrazellulär freisetzen. Nicht vitale Zellen weisen häufig Membranschäden auf, durch die der DNA-Farbstoff Gel Red in die Zelle eindringen und die DNA rot fluoreszierend anfärben kann. Beide Färbungen können gut im Mikroskop erkannt und die Prozentzahl grün bzw. rot fluoreszierender Zellen ermittelt werden.

Trypanblau färbt nur Zellen blau an, deren Zellmembran durchlässig ist. Vitale Zellen mit einer intakten Zellmembran nehmen keinen Farbstoff auf und erscheinen mikroskopisch transparent (Schrek 1936).

Gel Green ist ebenfalls ein fluoreszierender Farbstoff, der den Zellkern grün-gelblich und das Zytoplasma rot anfärbt. Diese einfache Färbemethode ermöglicht es, die Zellen mikroskopisch hinsichtlich morphologischer Abweichungen der Kernform und -struktur zu beurteilen.

1.8 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Schadensinduktion durch eine Kombination von Cisplatin und Hitze, wie sie auch in der HIPEC-Therapie verwendet wird, auf Tumorzellen in vitro mittels verschiedenen Methoden zu untersuchen. Zu Beginn bestand die Aufgabe darin, sowohl eine passende Zelllinie als auch Cisplatinkonzentration, Dauer der Inkubation und Temperatur zu ermitteln und anschließend als Standardanwendung für die Kombination zu definieren. Dabei wurden folgenden Methoden verwendet: Mikrokerntest, Comet-Assay, Vitalitätstest, Durchflusszytometrie (Apoptose, DCF, GSH) und quantitative und morphologische Auswertung mittels Neubauerkammer. Es sollte zudem geklärt werden, inwieweit Hyperthermie oder auch Zytostatika alleine eine qualitativ andere Wirkung auf kultivierte Tumorzellen besitzen als deren Kombination.

2 Material

2.1 Geräte

- accu Jet pro Brand Nr.: 09G13283 und Nr.: 09G13285
- Bauknecht Kühlschrank KG30/1 WS
- Bio Vortex V1 Nr.: N046906
- BioRad Nr.: 552BR004741
- BioRad PowerPac HC Seriennr.: 043BR36080
- Casy Model DT Seriennr.: DT-2GB-1066
- CO₂ Inkubator 1500
- Cytospin3 Thermo Shandon Seriennr.: MA2560E015
- Eismaschine Scotsman AF100 Seriennr.: 2424746
- Eppendorf Research 10-100µl US Patent 5.531.131
- FACS LSR Becton Dickinson Seriennr.: H0108
- FACScan Becton Dickinson Seriennr.: 04272
- Feinwaage Sartorius BP 210D Nr.: 70107587
- Feinwaage Sartorius BP210D Seriennr.:70107587
- Flow Antair Seriennr.: 6797
- Flow Gelaire Seriennr.: 82503
- Heizplatte Liebisch-Bielefeld Type 2138
- Inkubator Typ Herd cell Fabriknr.: 20001794 Bestellnr.: 5101356
- Inkubator Heraeus Typ B5060EKC02
- Kühlzentrifuge Universal 16R Typ 1602 Werknr.:387/6-02
- Magnetrührer IKAMAGREO Typ REO Nr.: 226072
- Megafuge 1.OR Fabriknr.: 40258965 Bestellnr.: 75003060/02
- Mikroskop Leitz Diavert Seriennr.: DL00841
- Mikroskop Nikon Eclipse TS100 Nr.: 601942
- Mikroskop Nikon Y-FL Seriennr.: 075384
- Mikroskop Thermo Dux precision line Seriennr.: 34785
- Mikroskop Zeiss Seriennr.: 2515
- Mikrowelle DeLonghi Typ MW 311 Seriennr.: 10809
- Neubauer Profonder Assistent Germany, A.Hartenstein

2 Material

- PC Apple + Belinea
- PC Apple + Multisync FE 1250+
- pH-Meter Schott TYP CG842
- Photometer Evolution 160 UV-VIS
- Pipetten: Eppendorf Research 0,5-10µl
- Rüttler KL2 Edmund Bühler GmbH
- Techne Heizplatte DRI Block DB2A
- Techne Heizplatte DRI Block DB2A
- Transferpette Brand 100-1000µl
- Transferpette Brand 10-100µl
- Vortexer Janke&Kunkel VF2
- Wasserbad GFL
- Wasserbad GFL Type 1012
- Zellcounter Counter AC-8
- Zentrifuge Heraeus Laborfuge 400E

2.2 Verbrauchsmaterial

- 6 Well-Plate, Sarstedt
- COMET Objektträger Thermo Scientific, Menzel Glaser Superfrost
- Deckgläser Marienfeld superior, A. Hartenstein
- Micotubes schwarz 1,5 ml, A. Hartenstein
- Micotubes transparent 1,5 ml, Sarstedt
- Objektträger Marienfeld superior, A. Hartenstein
- Parafilm „M“ Bemis, A. Hartenstein
- Safe seal microtubes transparent 2 ml, Sarstedt
- Schraubröhre 15 ml, Sarstedt
- Schraubröhre 50 ml, Sarstedt
- Tissue culture flask 25 cm², Sarstedt
- Tissue culture flask 75 cm², Sarstedt

2.3 Chemikalien

- 1,4 Diazabicyclo(2,2,2)octan, Sigma

- 2-Hydroxyethylagarose, Sigma
- Agarose MEEO Ultra Qualität, Roth
- Annexin-V-FLUOS, Roche
- Aphidicolin, Sigma
- Chlorwasserstoff, Roth
- cis-Diammineplatinum(II)dichloride, Sigma
- Dinatriumhydrogenphosphat, Sigma
- Cytochalasin B, from Drechslera dematioidea, Sigma
- Dimethylsulfoxid <99,8% p.a., Roth
- Dinatriumhydrogenphosphat, E. Merck
- DL-Buthionine-(S,R)-sulfoximine, Sigma
- EDTA <99% p.a. ACS, Roth
- Entwicklerflüssigkeit, Kodak
- Ethanol >99,8%, Sigma
- Hepes, Sigma
- Isopropanol, Roth
- Kaliumchlorid, Fluka
- Kaliumhydrogenphosphat, E. Merck
- Methanol, Roth
- Monobrom-(trimethylammonio)-biman-bromid, Sigma
- Natriumchlorid <99,5 % ACS, ISO, Roth
- Natriumhydroxid <99 %, Roth
- N-Laurosyl sarosine sodium salt, Sigma
- Propidium iodide solution, Sigma
- Rotenon, Sigma
- Gel Red, Biotrend Chemikalien GmbH
- Safe Green, Biotrend Chemikalien GmbH
- Sarcosinat, Sigma
- Sodium dodecyl Sulfat, Roth
- Tempol, Sigma
- Triton X-100, Sigma

2 Material

- VAS, Sigma
- Wasserstoffperoxid, Sigma

2.4 Medien und Lösungen für die Zellkultur

- Dulbecco's Modified Medium Eagle's - high glucose, Sigma
- Eagles Minimum Essential, Sigma
- Mc Coys 5A Medium, Sigma
- Penicillin-Streptomycin, Sigma
- Trypsin-EDTA solution, Sigma

2.5 Pufferlösungen für die einzelnen Methoden

2.5.1 Mikrokerntest

| |
|--|
| Safe Green Gebrauchslösung |
| 10 µl Stocklösung (Safe Green) 990 µl H ₂ O destl. |

2.5.2 Comet-Assay

| |
|--|
| Lysepuffer |
| 2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris 1 % Sarcosinat pH 10 mit NaOH-Plätzchen einstellen |

| |
|--|
| Lyselösung |
| 66,75 ml Lysepuffer 7,5 ml DMSO 0,75 ml Triton X-100 |

| |
|--|
| Elektrophoresepuffer |
| 120 ml 5 M NaOH 10 ml 0,2 M EDTA-Lösung mit 2 l destillierten Wasser |

| |
|--|
| Gel Red Gebrauchslösung |
| 10 ml Stocklösung (Gel Red) 990 µl H ₂ O dest. |

| |
|--|
| DABCO |
| 250 mg DABCO-Pulver 10 ml PBS 90 ml Glycerin |

| |
|--|
| PBS |
| 8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,42 g Na ₂ HPO ₄ 0,27 g KH ₂ PO ₄ |

2.5.3 Vitalitätstest

| |
|--|
| Vitalitätsfärbelösung |
| 2 ml PBS, 12 µl FDA Stammlösung 2 µl Gel Red Lösung |

2.5.4 Durchflusszytometrie

2.5.4.1 Apoptosedetektion mittels Annexin-V-FLUOS-Markierung

| |
|---|
| 10 x Bindungspuffer |
| 2,38 g Hepes 8,18 g NaCl 368 mg CaCl ₂ 100 ml H ₂ O destl. |

| |
|--|
| Inkubationspuffer |
| 10 mM Hepes 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂ |

| |
|----------------------------|
| Propidium Iodid Lösung /PI |
| 50 µg/ml |

| |
|--|
| Färbe-Mix |
| 960 µl Hepes-Bindungspuffer 20 µl Annexin-Stammlösung 20 µl PJ |

2.5.4.2 Quantifizierung des oxidativer Stress mittels GSH-Gehalts

| |
|---------------------------------|
| Monochlorobiman/MCB-Stammlösung |
| 4 mM MCB in PBS |

| |
|-------------------------------------|
| Monochlorobiman/MCB-Gebrauchslösung |
| 0,4 mM MCB in PBS |

2.5.4.3 Quantifizierung des oxidativen Stress mittels DCF-Gehalts

| |
|------------------------|
| DCFH-DA-Stammlösung |
| 200 mM DCFH-DA in DMSO |

| |
|-------------------------|
| DCFH-DA Gebrauchslösung |
| 20 mM DCFH-DA in DMSO |

3 Methoden

3.1 Literaturrecherchen

Für die Literaturrecherchen wurde die Datenbank Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) durchsucht, als auch der Onlinezugang zu Zeitschriften und Büchern der Bibliothek der Universität Würzburg verwendet. Älteren Veröffentlichungen, die nicht online zugänglich waren, wurden als gedruckte Ausgabe in der Universitätsbibliothek oder per Fernleihe ausgeliehen und kopiert. Die verwendete Literatur beschränkte sich dabei nicht ausschließlich auf Arbeiten von eingeschränktem Publikationsdatum oder auf Zeitschriften mit Gutachter-System („peer review“). Die Arbeiten waren in englischer, französischer oder deutscher Sprache verfasst. Ein weiteres Aufnahmekriterium war, dass die aufgeführten Versuche darüber hinaus über mehr als nur einer Kurzzusammenfassung („abstract“) verfügten.

3.2 Zellkultur

Die in der Arbeit verwendeten Zelllinien HT29, HaCat, Caco-2 und HCT116 wurden nach dem Auftauen bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % H₂O inkubiert und dabei wöchentlich zwei bis drei mal subkultiviert.

3.2.1 HT29-Zellen

HT29-Zellen sind humane adhärente Zellen des kolorektalen Karzinoms und werden in DMEM/high glucose Medium mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 0,4 % Antibiotika (50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Zur Ablösung der Zellen wurden sie nach einem Waschvorgang mit PBS fünf Minuten bei 37 °C mit 1 ml Trypsin-EDTA inkubiert. Um den Vorgang abzustoppen wurden 2 ml frisches Medium dazugegeben. Die Zellen wurden per Neubauer-Kammer ausgezählt und erneut ausgesät (500 000/ml).

3.2.2 CaCo-2-Zellen

CaCo-2-Zellen sind humane Zellen des Kolon-Adenokarzinoms und werden in Eagle's Minimum Essential Medium/MEM mit 20 % FCS, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, 1 % Na-Pyruvat, 1% L-Glutamin und 0,4 % Antibiotika (50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) kultiviert.

3.2.3 HCT116-Zellen

HCT116-Zellen sind humane Zellen des Kolonkarzinom und wurden in McCoy's 5a Medium mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Antibiotika (50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) kultiviert.

3.2.4 HaCat-Zellen

HaCat-Zellen sind humane, adhärenente, spontan immortalisierte Keratinozyten und werden in DMEM-high glucose Medium mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamine und 0,4 % Antibiotika (50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Zum Ablösen der Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS, wurden diese fünf Minuten lang bei 37 °C mit 2 ml PBS/EDTA vorbehandelt und dann mit 1 ml Trypsin fünf bis zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml frischem Medium ab gespült und zentrifugiert, per Neubauer-Kammer gezählt und erneut ausgesät (500 000/ml).

3.3 Zellzahlquantifizierung mittels Neubauerkammer und morphologische Auswertung mit Gel Green

Um die genaue Zellzahl nach Exposition der Zellen feststellen zu können, wurden diese getrennt nach adhärennten Zellen und Zellen im Überstand mittels Neubauerkammer ausgezählt. Die Neubauer-Zählkammer ist eine etwa 30 mm x 80 mm große und etwa 5 mm dicke Glasplatte mit einer vertieften Mittelfläche, auf der quadratische Felder definierter Größe eingätzt sind. Sie wird zur Zählung aller Arten von Teilchen, besonders von Zellen verwendet. Circa 20 µl der auszählenden Zellprobe wurden bei aufgelegtem Deckglas seitlich, nach gründlichem vortexen, aufpipettiert. Dabei saugt sich die Probe durch Kapillarkraft in den Hohlraum (Zählfelder) der Neubauerkammer. Nach Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden Zellen unter dem Lichtmikroskop mit Durchlicht lässt sich deren Anzahl je Volumeneinheit errechnen.

Zur zusätzlichen morphologischen Untersuchung wurden die Proben mittels einer Zytozentrifuge auf Objektträger aufgetragen, in Methanol eine Stunde fixiert und daraufhin mit Gel Green angefärbt. Die Proben wurden wiederum aufgeteilt nach adhärennten Zellen und abgelösten Zellen des Überstandes. Pro Probe wurden jeweils 2 Objektträger hergestellt und bei einer Gesamtzahl von 1000 Zellen die Zahl der apoptotischen Zellen bestimmt. In Anschluss daran wurden zur Dokumentierung der Ergebnisse Fotos von den Proben erstellt.

3.4 Gentoxizitätstests

3.4.1 Mikrokerntest

Während der Hitzeexposition und/oder Substanzbehandlung wurden die Zellen gleichzeitig oder über die Exposition hinaus 24 Stunden mit Cytochalasin B (3 µg/ml) inkubiert. Cytochalasin B ist ein Cytokinesehemmer, der verhindert, dass die Zelle sich teilt, obwohl die Zellkernteilung weiterhin fortschreitet. Folglich kommt es zur Bildung von doppel- als auch mehrkernigen Zellen.

Bei Fehlverteilung von Chromosomen oder Bruchstücken während der Mitose kann es neben der Bildung von Hauptkernen zu sogenannten Mikrokernen kommen. Mikrokerne stellen einen Index für die Genotoxizität der Exposition und/oder Substanzbehandlung dar.

Ausschließlich der am Boden der Kulturschale angewachsene Zellrasen wurde weiter verwendet und weiterverarbeitet. Nach Ablösung der exponierten Zellen wurde die Reaktion mit mindestens 2 ml frischem Medium abgestoppt und die Zellen für die Dauer von 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Zur Weiterverwendung des Zellpellets wurde diesem 1 ml Medium zugegeben, die Zellen per Neubauerkammer gezählt und per Zytozentrifuge auf Objektträger aufgetragen und zur Fixierung mindestens eine Stunde in Methanol bei -20°C gelagert. Zur Auswertung der Präparate wurden diese zuerst codiert und dann jeweils mit 10 µl SafeGreen Färbelösung 10 Minuten gefärbt. Nach Abwaschen des Farbstoffs mit H₂O wurden die Objektträger mit jeweils 10 µl DABCO zur Konservierung eingedeckt.

Zur Auswertung der Mikrokernpräparate wurde eine 400-fache Vergrößerung am Mikroskop Nikon Eclipse 55i verwendet. Durch die Verwendung eines FITC-Filters fluoreszierten die eingefärbten Zellkerne grün bis gelb während das Cytoplasma eine rote Farbe besaß. Pro Präparat wurden 1000 Zellen ausgezählt, wobei zwischen einkernigen, doppelkernigen und mehrkernigen Zellen, Mitosen, Apoptosen und doppelkernige Zellen mit Mikrokernen differenziert wurde. Unter anderem konnte daraus der Cytochalasin-B-Proliferationsindex (CBPI) wie folgt berechnet werden.

$$\text{CBPI} = \frac{1 \text{ EK} + 2 \text{ DK} + 3 \text{ MK}}{\text{EK} + \text{DK} + \text{MK}}$$

(EK = Einkernige, DK = Doppelkernige, MK = Mehrkernige)

Damit jeweils gleichmäßig viele doppelkernige Zellen beurteilt wurden, wurden nach Errechnung des CPBI pro Objektträger insgesamt immer 1000 doppelkernige Zellen hinsichtlich der Gegenwart von Mikrokernen ausgezählt.

Im Fall der HT29 Zellen wurde die Bedeutung der Passagezahl, d.h wie häufig die Zellen subkultiviert worden waren, in die Auswertung einbezogen. Dabei wurden die gleichen Versuche jeweils mit einer Kultur niedriger bzw. hoher Passagenzahl durchgeführt. Ebenfalls im Mikrokerntest wurden zwei pharmakologische Inhibitoren – der Superoxidscavenger Tempol und der NADPH-Oxidase-Inhibitor VAS - eingesetzt, um den Mechanismus der Mikrokernbildung zu analysieren.

3.4.2 Comet-Assay

Zur Vorbereitung der Versuche wurden am Tag vor der Versuchsreihe vier 6-Wellplatten mit 400 000 Zellen pro Well und jeweils 3 ml Medium versehen und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Vorarbeiten im Labor hatten Konzentrationen von 50 µg/ml Cisplatin sowie 125 µM H₂O₂ (Positivkontrolle) als geeignet ermittelt. Am Versuchstag wurden je Platte zwei Wells mit 50 µl 0,9 % NaCl und zwei weitere mit 50 µg/ml Cisplatin behandelt. Die Inkubationszeit betrug mit Cisplatin eine Stunde. Die Versuche unterschieden sich darin, dass jeweils eine der beiden Platten während der einstündigen Behandlung bei 37 °C und die andere je nach Versuch bei 40 °C oder 42 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Nach Wechsel des Mediums sowie nach einer vierstündigen Behandlungspause zur Umwandlung von DNA-Läsionen in Strangbrüche durch die Zellen wurde jeweils ein Well, das zuvor mit NaCl (Lösungsmittelkontrolle) und ein Well, das zuvor mit Cisplatin behandelt wurde, mit 125 µM H₂O₂ 30 min lang bei 37 °C inkubiert.

Nach Abschluss der Exposition oder Substanzbehandlung der Zellen wurden diese von der Zellplatte abgelöst, in Medium aufgenommen und abzentrifugiert (5 min bei 1000 U/min). Nach Abkippen des Überstandes wurde das verbliebene Zellpellet mit 180 µl Low-Melting-Point-Agarose (LMP-Agarose) gut gemischt. Zudem wurden pro Probe zweimalig je 45 µl auf einen Objektträger gegeben, der zuvor mit High-Melting-Point-Agarose (HMP-Agarose) beschichtet wurde. Damit sich die Zellsuspension gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt, wurde außerdem ein Deckgläschen so lange aufgelegt bis die Agarose-Zellsuspensionslösung sich verfestigt hat. Die Objektträger wurden daraufhin mindestens für eine Stunde bei 4 °C in einer Lyse-Lösung inkubiert.

Im Anschluss wurden die Objektträger 20 Minuten bei 4 °C in der Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer zur Entwindung der DNA inkubiert. Nach Einstellung einer Spannung von 25 V und der Stromstärke von 300 mA durchliefen die Proben die Elektrophorese für 20 Minuten. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Objektträger mit Tris Puffer gewaschen, 5 Minuten in Methanol fixiert und danach 10 Minuten im Brutschrank bei 37 °C getrocknet.

Die Versuche wurden unabhängig voneinander dreimal durchgeführt, und je Probe wurden 100 Zellkerne mikroskopisch ausgewertet.

Zur Auswertung wurden die Objektträger codiert und gefärbt. Dazu wurde eine Färbelösung aus Gel Red und DABCO (1:3) verwendet. Die Auswertung der Proben erfolgte mit Hilfe des Programms Komet 5, computergestützt mit dem Mikroskop Labophot-2 (Nikon), dazu wurde ein 20-fach vergrößerndes Objektiv verwendet. Pro Objektträger wurden 50 Zellen ausgewertet und in jeder Zelle der prozentuale Anteil der DNA im Kometschweif gemessen.

3.4.3 Apoptosedetektion mittels Annexin-V-FLUOS Markierung

Der Begriff Apoptose bezeichnet den „programmierten bzw. geplanten“ Tod einer Zelle. Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse mit Annexin V können apoptotische Zellen detektiert werden (Vermes et al. 2000; Vermes et al. 1995). Dabei macht man sich die Tatsache zu nutze, dass die Aminosäure Phosphatidylserin normalerweise auf der Zellinnenseite der Membran der vitalen Zelle vorzufinden ist. Bei Ablauf eines programmierten Zelltodes/Apoptose wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran transloziert (Elmore 2007). Der Farbstoff Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin und kann somit diese Zellen identifizieren (Tait et al. 1989).

Bei nekrotischen Zellen ist in einem späten Stadium deren Membran so durchlässig, dass Annexin V in die Zelle eindringen kann und sich an die Innenseite der Membran an Phosphatidylserin bindet (Vermes et al. 1995). Daher verwendet man zur Differenzierung von apoptotischen zu nekrotischen Zellen zusätzlich einen weiteren DNA-Farbstoff, der nur die permeable Membran von Nekrosen passieren kann. Dieser zweite DNA färbende Farbstoff ist Propidiumiodid. Lebende Zellen werden daher im Durchflusszytometer als Annexin-negativ und Propidiumiodid-negativ, frühe apoptotische Zellen Annexin-positiv und Propidiumiodid-negativ detektiert. Annexin-positiv und Propidiumiodid-positiv Zellen im oberen rechten Quadranten können unspezifisch auf späte Apoptosen oder Nekrosen hindeuten.

Die Zellen wurden nach Exposition mittels Trypsinbehandlung abgelöst und bei 1000 Umdrehungen 5 min lang abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit Hepes Bindungspuffer gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Anfärbung und Durchmischung der Zellpellets mit 100 µl Färbe Mix. Die Inkubationsdauer betrug 20 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Zum Reaktionsstopp wurde der Zell-Färbe-Suspension 400 µl Hepes-Bindungspuffer zugegeben und die Probe in FACS-Röhren überführt. Zur Analyse im Durchflusszytometer wurde für die Annexin-Fluoreszenz-Detektion eine Anregung bei 488 nm und ein Bandpass-Filter bei 515 nm benötigt. Für die Propidium-Iodid Detektion wurde ein Filter bei 600 nm benutzt.

3.4.4 Quantifizierung von oxidativem Stress mittels Messung des GSH-Gehaltes

Um den oxidativen Stress in der Zelle zu quantifizieren, bedient man sich der Messung des zellulären GSH-Gehalts. Freie Radikale, welche durch oxidativen Stress entstehen, bewirken eine Oxidation von 2 GSH Molekülen zu einem GSSG-Molekül, wodurch der GSH-Gehalt in der Zelle sinkt (Rice et al. 1986). Diese Reaktion kann durch die Zugabe von dem Fluoreszenzfarbstoff Monochlorobiman und darauffolgende Messung im Durchflusszytometer detektiert werden. Zusätzlich wurde in den Versuchen noch Buthioninsulfoximin (BSO) verwendet, das mit seiner Eigenschaft als irreversibler Inhibitor der γ -Glutamylcystein-Synthese vermehrt zu oxidativen Stress führt, da durch die Hemmung der GSH Bildung der Glutathionvorrat der Zelle nach und nach aufgebraucht wird (Griffith et Meister 1979).

Die HT29-Zellen wurden nach der Exposition hierfür geerntet, gezählt und bei 4 °C zentrifugiert. Zellen und Überstand wurden jeweils getrennt voneinander einzeln verarbeitet und ausgewertet. Nach der Zentrifugation wurden die Zellpellets mit 1 ml PBS gewaschen, erneut bei 4 °C zentrifugiert und in 300 µl des Fluoreszenzfarbstoffs MCB (0,4 mM in PBS) resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen 30 min abgedunkelt auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze erneut mit 1 ml PBS versetzt und 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde dieser Waschvorgang wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500 ml PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen aufgenommen.

Zur Analyse wurden die Proben direkt im Anschluss im Durchflusszytometer gemessen. Der Farbstoff Monochlorobiman wird mit dem UV-Laser (325 nm) angeregt, wobei der Messbereich auf 424/444 nm durch einen Bandpassfilter abgegrenzt wird. Pro Probe wurden 20 000 Ereignisse gemessen und die mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt. Zu beachten war, dass die Messung innerhalb von kürzester Zeit von wenigen Minuten erfolgen musste, da die Fluoreszenzintensität rasch abnimmt und die Ergebnisse dadurch verfälscht werden können.

3.4.5 Quantifizierung des oxidativen Stress' mittels Messung des DCF-Gehalts

Durch Entstehung von oxidativem Stress wird das Redoxgleichgewicht in den Zellen verschoben. Durch die Bildung von Radikalen kommt es zur Oxidation von DCFH-DA zu DCF, welches zum Zweck der Analyse zur Zellsuspension verwendet wird (Keston et Brandt 1965). DCF wird im FACS zur Fluoreszenz angeregt. Die Messung des fluoreszierenden DCF-Gehaltes kann zur Quantifizierung von oxidativen Stress in der Zelle herbeigezogen werden.

Die Zellen wurden für den Versuch nach Exposition abgelöst, gezählt und zentrifugiert. Nachdem das Zellpellet in 3 ml Medium resuspendiert wurde, konnte es in Falconröhrchen überführt werden. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µM H₂O₂ pro Röhrchen 30 min lang inkubiert, um eine Positivkontrolle zu erhalten. Nach zehn Minuten Wartezeit wurden pro ml Medium 0,5 µl einer 20 mM DCFH-DA in DMSO-Gebrauchslösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4° C und 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit kaltem 1 % BSA-PBS gewaschen, und erneut bei 4 °C und 15000 rpm 5 min lang zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Zur Auswertung wurden die Proben in 500 µl kaltem 1 % BSA-PBS aufgenommen, resuspendiert, in FACS-Röhrchen auf Eis gestellt und im Durchflusszytometer analysiert.

Im Durchflusszytometer wird der Farbstoff zur Analyse mit Hilfe des Blaulicht-Lasers (488 nm) angeregt. Der Messbereich wird hierbei durch einen 530/28 nm Bandpassfilter abgegrenzt. 20 000 Ereignisse wurden gemessen und dabei die mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt.

3.5 Vitalitätstest und morphologische Betrachtung im Mikroskop

Anhand der teils unerwarteten Ergebnisse aus den verschiedenen Methoden im Verlauf der Arbeit stellte sich immer mehr die Frage, wie die untersuchten Zellen sich visuell morphologisch darstellten. Neben der morphologischen Auswertung wurden ebenfalls immer aus derselben Probe ein Teil der Zellen für einen Vitalitätstest mittels Fluoresceindiacetat (FDA) und Gel Red entnommen.

Anhand der mikroskopischen Auswertung wurden die Zellen in solche mit normaler Kernmorphologie und solche mit kondensiertem Chromatin unterteilt. Es wurden außerdem Fotos von angefärbten ausgewerteten Zellen der Versuche aufgenommen, um deren veränderte Morphologie besser darstellen zu können.

3.5.1 Vitalitätstest mittels Fluoresceindiacetat (FDA) und Gel Red

Um die Überlebensfähigkeit von Zellen nach der Exposition mit Testsubstanzen zu bestimmen, wurde ein Vitalitätstest verwendet. Dabei wird durch Färbung der DNA mit Gel Red die Membranintegrität überprüft. Aktive Esterasen in vitalen Zellen spalten Fluoresceindiacetat und es entsteht grün fluoreszierendes Fluorescein. Zur Anfärbung der Proben wurden 35 µl Zellsuspension und 15 µl der Vitalitätsfärbelösung gemischt. Im Anschluss wurden jeweils zwei Mal 15 µl des Gemisches auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas eingedeckt.

Zur Analyse wurde ein Mikroskop mit Fluoreszenzfilter mit Anregungswellenlänge im blauen Bereich und eine 40-fache Vergrößerung der Proben verwendet. Pro Objektträger wurden 200 Zellen ausgezählt.

Dabei wurden solche Zellen als vital gewertet, welche sich grün anfärben ließen. Avitale Zellen stellten sich rot dar und wurden somit auch in der Auswertung so beschrieben.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 22.0.

Dabei wurden alle Versuche, die mindestens 3-malig unabhängig wiederholt wurden, einer statistischen Analyse unterzogen. Alle Werte wurden zu Beginn mit dem Kruskal-Wallis-Test auf eine generelle Signifikanz untersucht. Nur beim Auftreten einer asymptomatischen Signifikanz $\leq 0,05$ wurde daraufhin der Mann Whitney U Test zur weiteren Analyse verwendet. Falls dies nicht der Fall war, wurde von einer weiteren statistischen Begutachtung abgesehen.

Bei Ergebnissen, welche mit dem Mann Whitney U Tests statistisch analysiert wurden, wurde ein Signifikanzwert von $p \leq 0,05$ festgelegt und in den Abbildungen mit dem Zeichen * = $p \leq 0,05$ vs. NK gekennzeichnet.

Bei weiter errechneten Signifikanzen von $p \leq 0,05$ innerhalb der Ergebnisse (also nicht im Vergleich zur Negativkontrolle, sondern zu einem anderen Versuchsansatz) wurden die beiden gegeneinander getesteten Datenreihen mit Klammern kenntlich gemacht und ebenfalls mit einem Zeichen (z.B. #) markiert. Nicht signifikante Daten $p > 0,05$ wurden in den Abbildungen nicht explizit kenntlich gemacht.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche zur Identifizierung geeigneter Zelllinien für Hitze-Exposition mittels Mikrokerntest

Zunächst sollte eine geeignete Zelllinie für die Versuche gefunden werden. Dies wurde mit Hilfe des Mikrokerntests, in dem auch Apoptose und Zellproliferation erfasst wurden, bewerkstelligt. Auch sollte mit dieser Testmethode der Wirkungsbereich und die Inkubationsdauer für Hitze und Cisplatin zunächst einzeln eingegrenzt und untersucht werden, um im Anschluß Kombinationen beider Einwirkungen testen zu können. Dabei wurden die Zelllinien HCT116, HaCat, CaCo-2 und HT29 untersucht. Die verwendeten Zelllinien HCT116, CaCo-2 und HT29, haben ihren Ursprung im humanen Kolonkarzinom, welche zu den Hauptentitäten der Peritonealkarzinose zählt. HaCat-Zellen stammen von humanen Keratinozyten ab und zeichnen sich durch ihre stark erhaltene Fähigkeit zur Differenzierung aus. Diese Zellen wurden gewählt, um zu beobachten ob epitheliale Zellen mit weitgehend erhaltenen Eigenschaften von Primärzellen anders reagieren als die Adenokarzinomzellen des Kolonkarzinoms.

4.1.1 HCT116-Zelllinie

Zunächst wurde der Einfluss von Hitze auf die Genomintegrität von HCT116 Zellen untersucht. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37 °C und 40 °C kultiviert (siehe Abbildung 7).

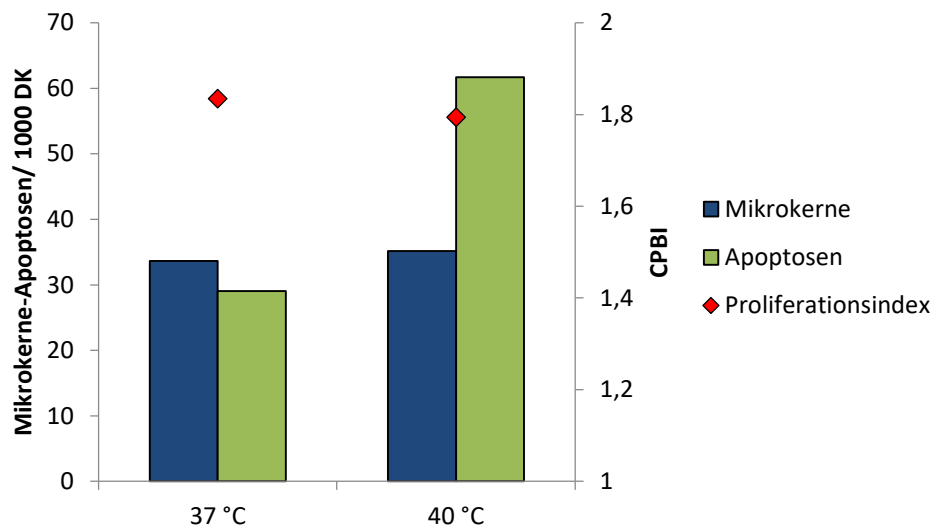


Abbildung 7: Mikrokerntest – HCT116, 24 Stunden Kultivierung bei 37 °C oder bei 40 °C; n=1

Während sich keine Zunahme der Mikrokernanzahl zeigte, kam es zu einem deutlichen Anstieg der Apoptosen bei der Temperatur von 40° C. Dabei war zu erkennen, dass der Proliferationsindex nur sehr leicht absank.

4.1.2 HaCat-Zelllinie

Die HaCat-Zellen wurden ebenfalls 24 Stunden bei 37 °C und 40 °C kultiviert, zusätzlich wurden noch die Reagenzien VAS und Tempol zu dem Versuch hinzugefügt. Tempol ist ein Antioxidanz als auch Radikalfänger und VAS ein spezifischer NADPH-Oxidase-Inhibitor, welche verwendet wurden, um den Einfluss von oxidativem Stress in der Schädigung durch Hitze genauer darzustellen. In Abbildung 8 sind die erzielten Ergebnisse abgebildet:

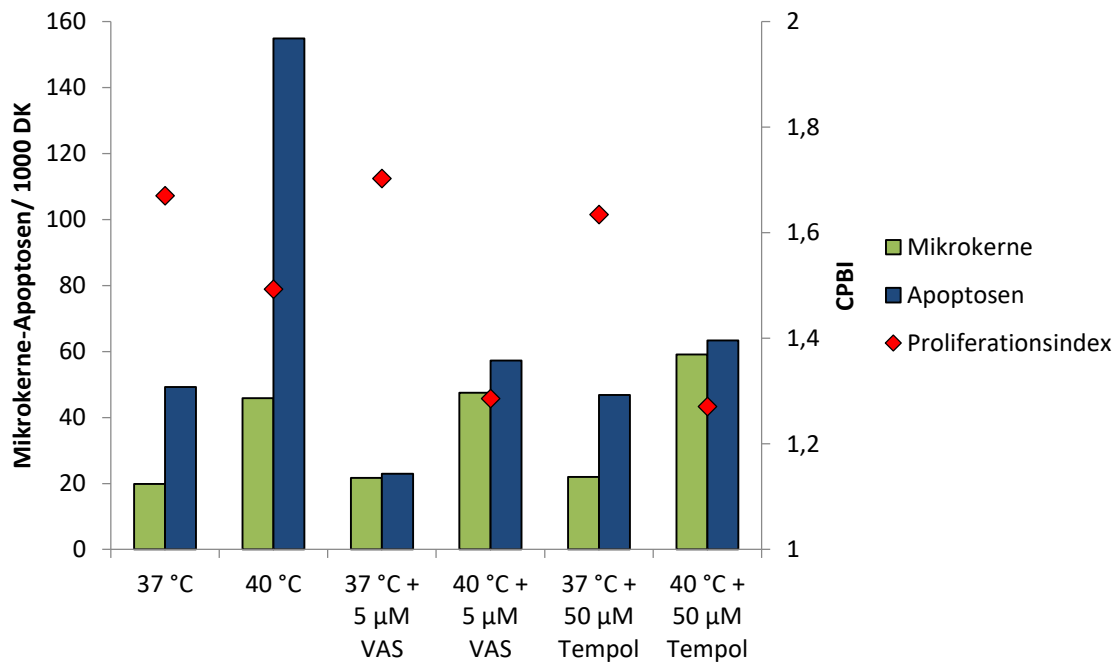


Abbildung 8: Mikrokerntest – HaCaT, 24 Stunden Kultivierung bei 37 °C oder bei 40 °C mit/ohne 5 µM VAS oder 50 µM Tempol; n=1

Bei der Temperaturerhöhung von 37 °C auf 40 °C, waren neben einer beinahe Verdoppelung der Mikrokerne auch eine starke Zunahme der Apoptosen und eine deutliche Abnahme des Proliferationsindex zu erkennen. Bei der Zugabe von 5 µM VAS konnte man keine großen Veränderungen in der Mikrokernbildung feststellen, wobei die Apoptosen deutlich verringerte Werte zeigten und auch der Proliferationsindex bei 40 °C deutlich geringer als bei der Negativkontrolle ohne Reagenz war.

Bei der Inkubation mit 50 µM Tempol zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Behandlung mit VAS. Hier war sogar eine geringe Zunahme der Mikrokernbildung bei 40 °C gegenüber der Kontrolle bei 40 °C zu verzeichnen. Wiederum fand sich eine geringere Apoptosehäufigkeit und ein reduzierter Proliferationsindex im Vergleich zu 40°C ohne Tempol. Somit wurde mit der Inhibierung des Superoxid-produzierenden Enzyms NADPH-Oxidase durch VAS sowie mit dem Superoxid-Scavenger Tempol ein vergleichbarer Effekt erzielt.

4.1.3 CaCo-2-Zelllinie

Um den Effekt der Hyperthermie zu beobachten, wurden die CaCo-2 Zellen jeweils auch bei 37 °C und 40 °C 24 Stunden kultiviert (siehe Abbildung 9).

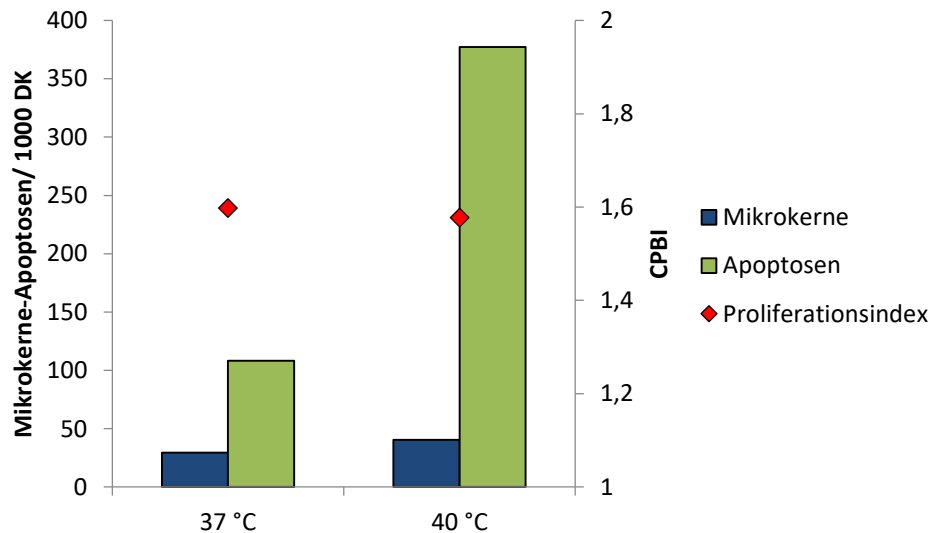


Abbildung 9: Mikrokerntest – CaCo-2, 24 Stunden Kultivierung bei 37 °C oder bei 40 °C; n=1

Das Ergebnis (Abbildung 9) zeigt, dass generell eine höhere Anzahl von Mikrokerneln, im Vergleich zu den anderen Zelllinien, schon bei der Negativkontrolle von 37 °C vorzufinden war und diese Mikrokerne jedoch bei einer Hyperthermie von 40 °C nur geringfügig zunahm. Der Proliferationsindex veränderte sich durch die Hitzeeinwirkung nur minimal. Jedoch erkannte man eine deutliche Zunahme von apoptotischen Zellen.

4.1.4 HT29-Zelllinie

Mit HT29 Zellen wurden weitere Vorversuche mit unterschiedlicher Expositionsdauer bei 40 °C und 42 °Grad Celsius, der Ermittlung von Dosis-Wirkungsbeziehungen von Cisplatin, sowie der Kombination von Hyperthermie und Cisplatin, durchgeführt. Erste mechanistische Erkenntnisse wurden mit der Zugabe von VAS (NADPH-Oxidase-Inhibitor) und Tempol (Superoxidscavenger) untersucht. Zusätzlich wurden Vergleichsversuche von Kulturen mit unterschiedlich hoher Passagenzahl durchgeführt.

Bei den Zeitintervallversuch mit 40 °C bzw. 42 °C wurden die Zellen 2 Stunden, 8 Stunden oder 24 Stunden behandelt (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11). Die Gesamtkubation betrug immer 24 Stunden, so dass die Zellen nach der Hyperthermieexposition noch weiter bei 37 °C im Brutschrank verblieben.

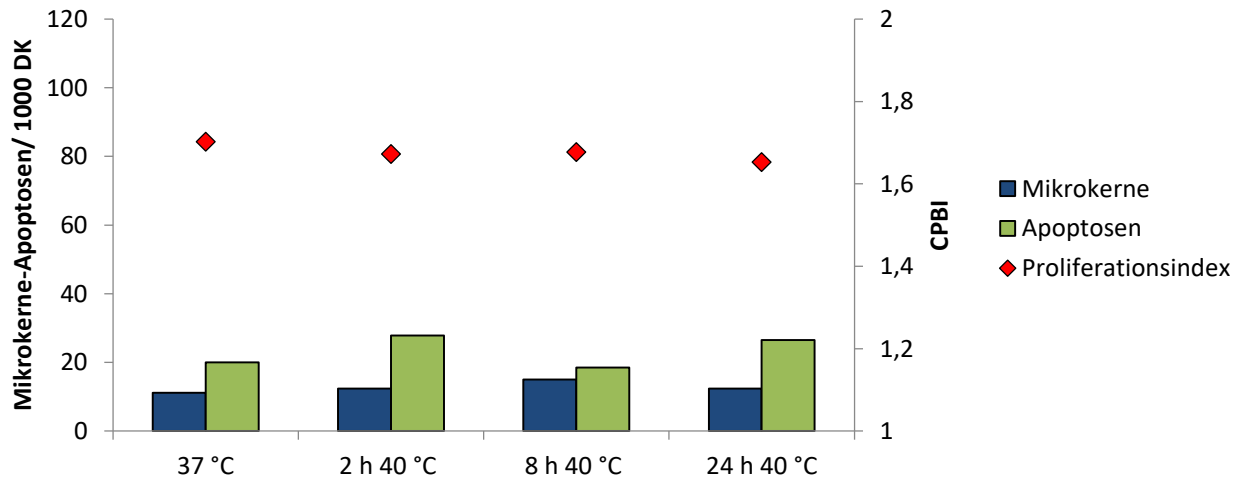


Abbildung 10: Mikrokerntest – HT29 Zeitintervallversuche mit 40 °C - Expositionszeiten von 2 Stunden, 8 Stunden und 24 Stunden, n=1

Die Endpunkte Mikrokernfrequenz, Proliferationsindex und Apoptosefrequenz zeigten nur geringe Änderungen, deren Wiederholbarkeit weiter analysiert werden müsste.

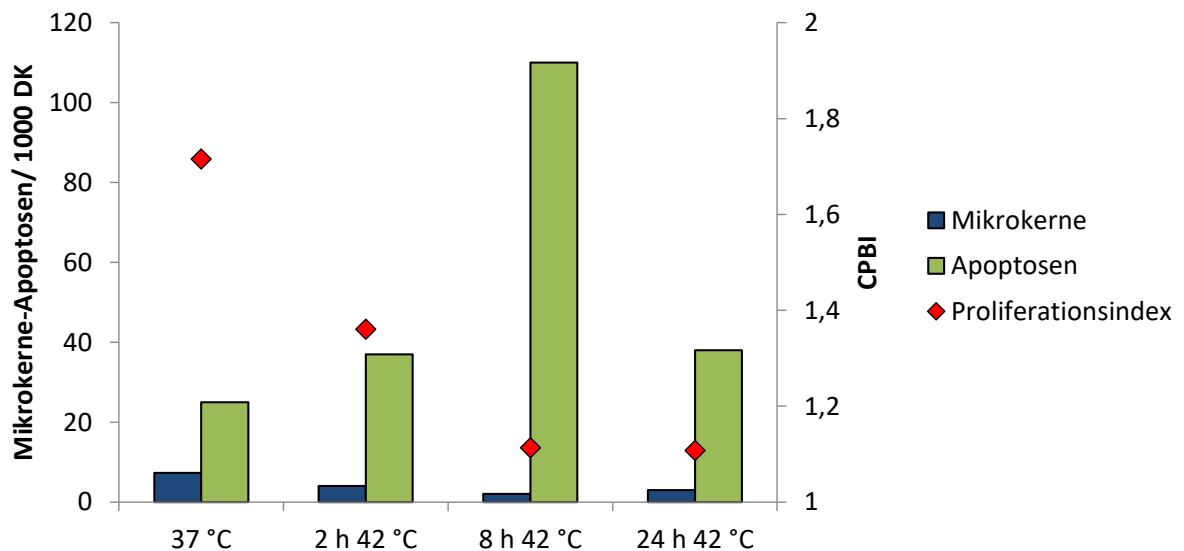


Abbildung 11: Mikrokerntest – HT29 Zeitintervallversuche mit 42 °C - Expositionszeiten von 2 Stunden, 8 Stunden und 24 Stunden, n=1

Bei der Inkubation bei 42 °C war sichtbar (Abbildung 11), dass die Bildung von Mikrokerneln tendenziell eher abnahm und die Zellen sich kaum mehr teilten. Die vom Zellrasen gewonnenen Objektträger zeigten eine Anzahl der apoptotischen Zellen, die von der 2-stündigen zur 8-stündigen Behandlung stark zunahm, jedoch bei der 24-stündigen Behandlung wieder absank.

Zur Untersuchung der Schädigungsmechanismen bei Hyperthermie wurden die Zellen parallel zur Hyperthermie mit 50 µM Tempol (Superoxidscavenger) inkubiert (siehe Abbildung 12).

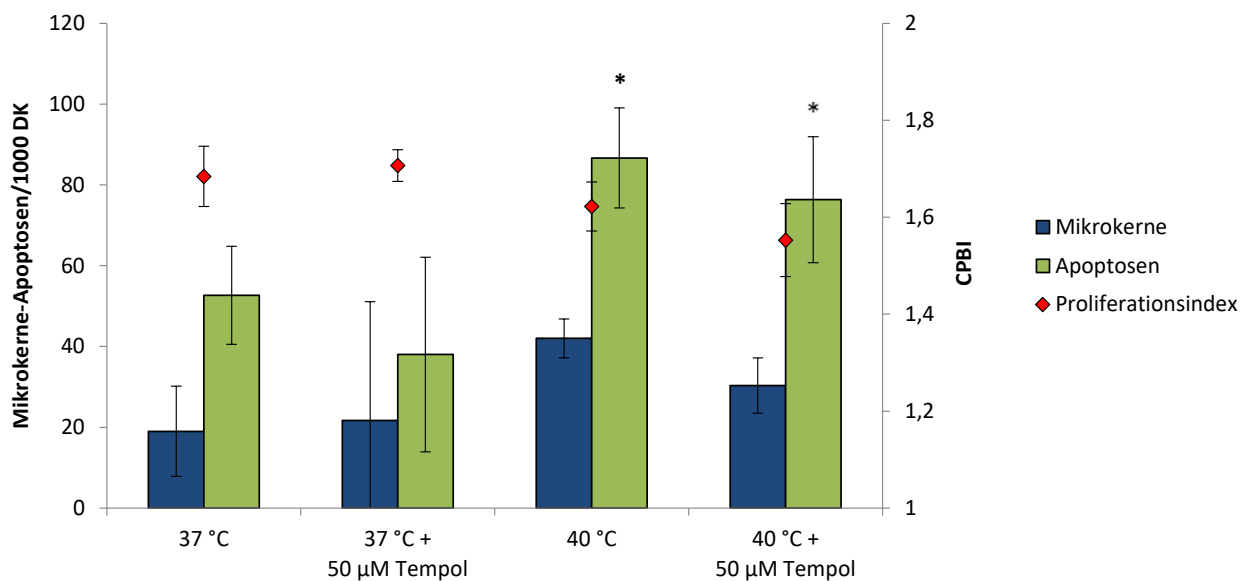


Abbildung 12: Mikrokerntest – HT29 Hitzeexposition bei 37 °C oder bei 40 °C mit 50 µM Tempol; Inkubationszeit 24 Stunden, n=3
Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = $p \leq 0,05$ vs. NK, Mann Whitney U Test

Durch die Zugabe von Tempol bei der Temperatur von 37 °C zeigte sich eine minimale Erhöhung der Mikrokernelzahl, während der Proliferationsindex fast gleich blieb. Die apoptotischen Zellen sanken in ihrer Anzahl ab, wobei die Standardabweichung bei der 37 °C Probe mit Tempol im Vergleich zu den anderen Proben viel höher war.

Im Vergleich dazu war die Mikrokernanzahl bei 40 °C um das Doppelte höher, die Apoptosen stiegen signifikant an ($p=0,05$) und der Proliferationsindex war abfallend. Bei Zugabe des Antioxidans Tempol verringerte sich die Mikrokernbildung und auch der Proliferationsindex, wobei die apoptotischen Zellen gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöht waren ($p=0,05$); im Vergleich zu alleinigen 40 °C Kontrolle jedoch verringert.

In dieser Versuchsreihe zeigte sich somit ein Hinweis darauf, dass eine Temperaturerhöhung auf 40 °C zu einem Anstieg von Mikrokernen führt, als auch zu einer höheren Anzahl an Apoptosen.

In Experimenten, in welchen die Passagenzahl der HT29 Zellen im direkten Vergleich (hohe Passagenzahl gegen niedere Passagenzahl) getestet wurden, wurden die Zellen 24 Stunden bei 37 °C und 40 °C inkubiert und danach ausgewertet.

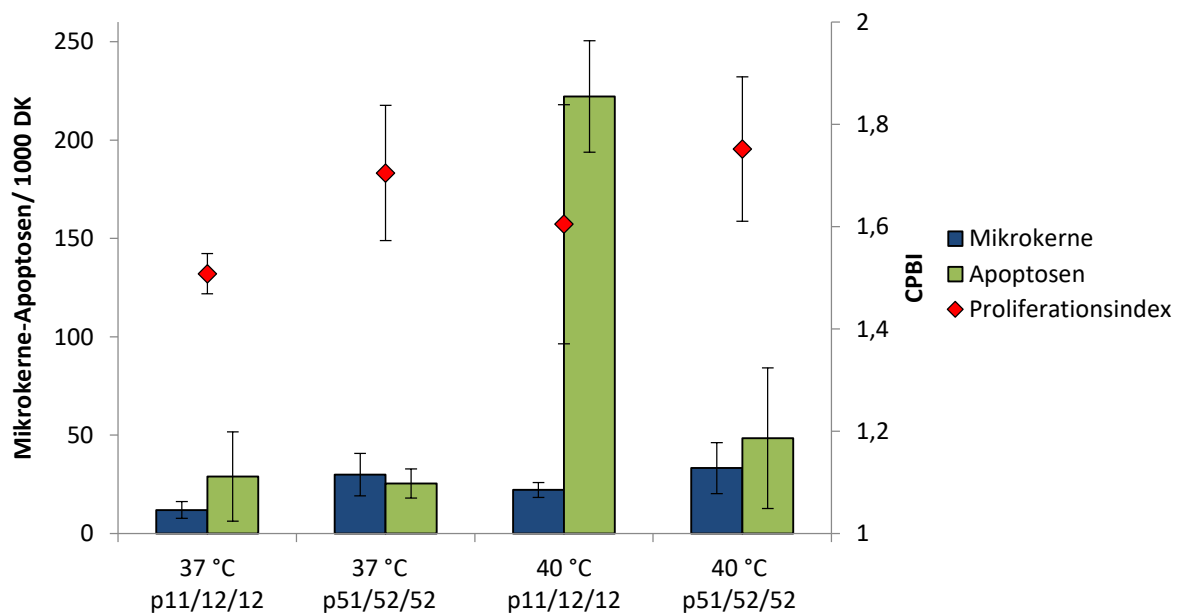


Abbildung 13: Mikrokerntest – HT29 Passagenvergleich p11/12/12 und p51/52/52 bei 37 °C oder bei 40 °C, Inkubationszeit 24 Stunden; $n=3$

Die Mikrokernbildung bei den niedrigen Zellpassagen (p11/12/13) zeigte bereits bei 37 °C einen niedrigeren Wert an als in den Zellen mit höherer Passagenzahl (p51/52/52). Die Apoptosenanzahl war bei beiden fast identisch, während der Proliferationsindex bei den höheren Passagen deutlich anstieg. Bei der Hyperthermie (40 °C) war die Mikrokernbildung bei den niedrigeren Passagen höher als bei der 37 °C, der Proliferationsindex stieg etwas an und die Apoptosenanzahl nahm stark zu. Die hohen Passagen zeigten keine (signifikante) Zunahme der Mikrokerne und keine erneute Zunahme des Proliferationsindex. Eine Zunahme der Apoptosenanzahl im Vergleich zu den 37 °C-Proben und zu den Werten der niedrigen Passagen war nicht zu beobachten. Da sich hier zeigte, dass die Passagenzahl einen großen Einfluss auf die Reaktion der Zellen haben kann, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit darauf geachtet, alle weiteren Experimente mit Zellen ähnlicher Passagenzahl durchzuführen.

4.1.5 Vorversuche mit HCT116, HaCaT, HT29 und CaCo-2 Zellen im Mikrokerntest

Insgesamt zeigte sich, dass alle Zellsorten außer die HaCaT vergleichbar auf Hitze reagierten. In den folgenden Versuchen wurden nur noch die Zellsorten HT29 und CaCo-2 verwendet, nunmehr aber alle Experimente in drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt, sodass Signifikanzberechnungen möglich wurden.

4.2 Comet-Assay mit Kombination von Hitze und Cisplatin

Für den Comet-Assay wurden die Zellen jeweils eine Stunde bei 37 °C als Negativkontrolle, 40 °C oder bei 42 °C inkubiert. Gleichzeitig wurde bei einigen Versuchsansätzen eine Cisplatin-Behandlung durchgeführt. Nach der Hyperthermie- und Cisplatin-Exposition wurde das Medium bei allen Versuchsansätzen gewechselt, danach erfolgte eine vierstündige Behandlungspause. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 125 µM H₂O₂ 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert.

H₂O₂ induziert DNA-Strangbrüche und somit die Bildung von sichtbaren Kometenschweifen im Comet-Assay. Nach Quervernetzung der DNA z.B. durch die vorherige Cisplatin-Behandlung wird die Möglichkeit der geschädigten DNA, durch Wanderung in der Elektrophorese einen Schweif zu bilden, reduziert. Das Ausmaß dieser Reduktion zeigt somit die Effizienz der Quervernetzung durch Cisplatin an. Falls diese durch Hitze intensiviert würde, würde man eine weitere Reduktion der H₂O₂-verursachten Schweifbildung erwarten.

4.2.1 HT29-Zelllinie

Die Konzentration von 125 µM H₂O₂ als auch von 50 µg/ml Cisplatin zeigten in Vorversuchen im Labor in dieser Variante des Comet-Assay die besten Ergebnisse, und wurden daher in den weiteren Versuchen verwendet. Die Versuche wurden zuerst bei 37 °C (Abbildung 14) und 40 °C (Abbildung 15) durchgeführt und im Anschluss daran mit 42 °C (Abbildung 16). Zusätzlich wurde parallel zum Comet-Assay bei allen Versuchen ein Zytotoxizitätstest zur Vitalitätsbestimmung durchgeführt.

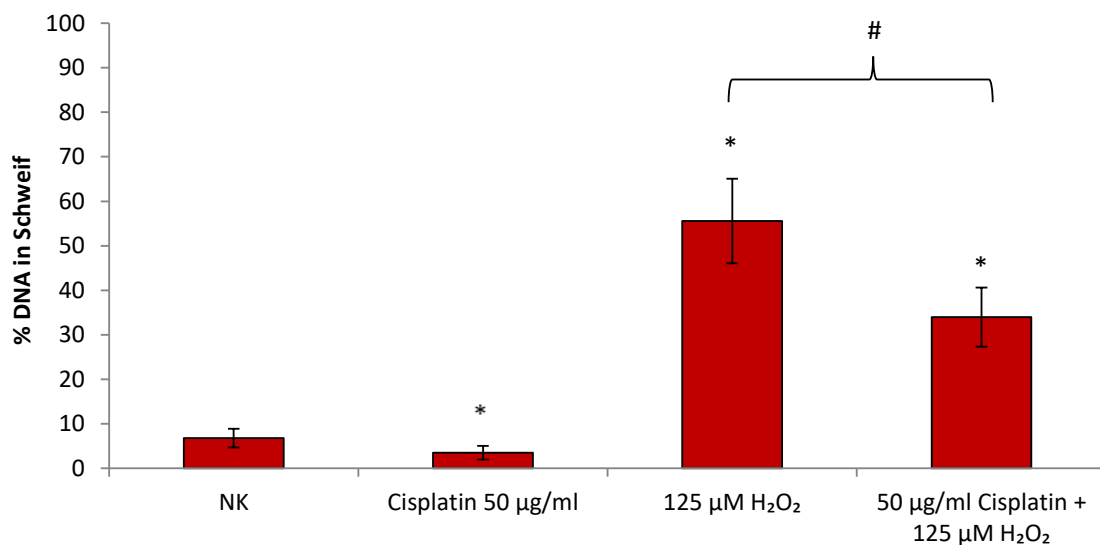


Abbildung 14: Comet-Assay - HT29 Hitzeexposition bei 37 °C mit/ohne 125 µM H₂O₂ und mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3, Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = $p \leq 0,05$ vs. NK, # = $p \leq 0,05$ - 125 µM H₂O₂ vs. Cisplatin 50 µg/ml + 125 µM H₂O₂, Mann Whitney U Test

Bei der normothermen Behandlung der Zellen bei 37 °C (Abbildung 14), konnte bei der Negativkontrolle eine Auswirkung von ca. 6,8 % der DNA im Schweif detektiert werden. Vergleichend dazu wurde bei der Behandlung mit Cisplatin unter 5 % der prozentualen DNA im Schweif gemessen. Dabei konnte sogar eine signifikante Abnahme der DNA im Schweif gegenüber der Negativkontrolle detektiert werden. Die Exposition mit 125 µM H₂O₂ zeigte als Positivkontrolle eine signifikante Erhöhung des DNA-Schadens. Durch die Kombination von Cisplatin und H₂O₂ konnte dieser Zellschaden wiederum signifikant zur Negativkontrolle, aber auch zur H₂O₂-Positivkontrolle erniedrigt werden.

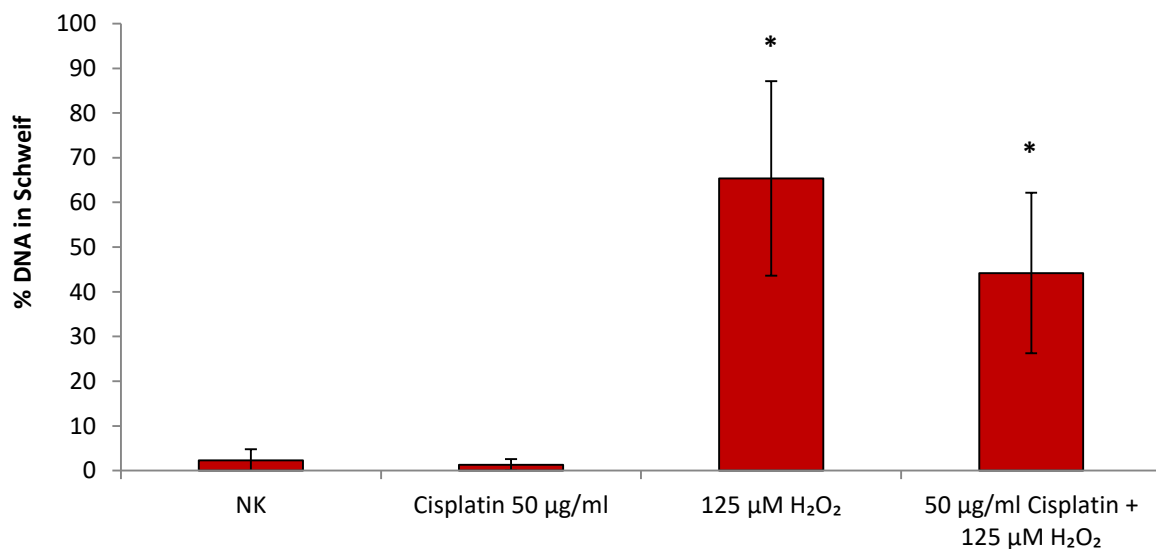


Abbildung 15: Comet-Assay - HT29 Hitzeexposition bei 40 °C mit/ohne 125 µM H₂O₂ und mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3, Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = $p \leq 0,05$ vs. NK, Mann Whitney U Test

Die Durchführung des Versuchs bei 40 °C ergab im Vergleich zum 37 °C-Versuch sehr ähnliche Ergebnisse. Allerdings war der Abfall der prozentualen DNA im Schweif im Kombinationsversuch von H₂O₂ mit 50 µg/ml Cisplatin etwas schwächer ausgebildet und daher nicht im Signifikanzniveau, ebenso wie die Reduktion nach Cisplatinbehandlung im Vergleich zur Kontrolle.

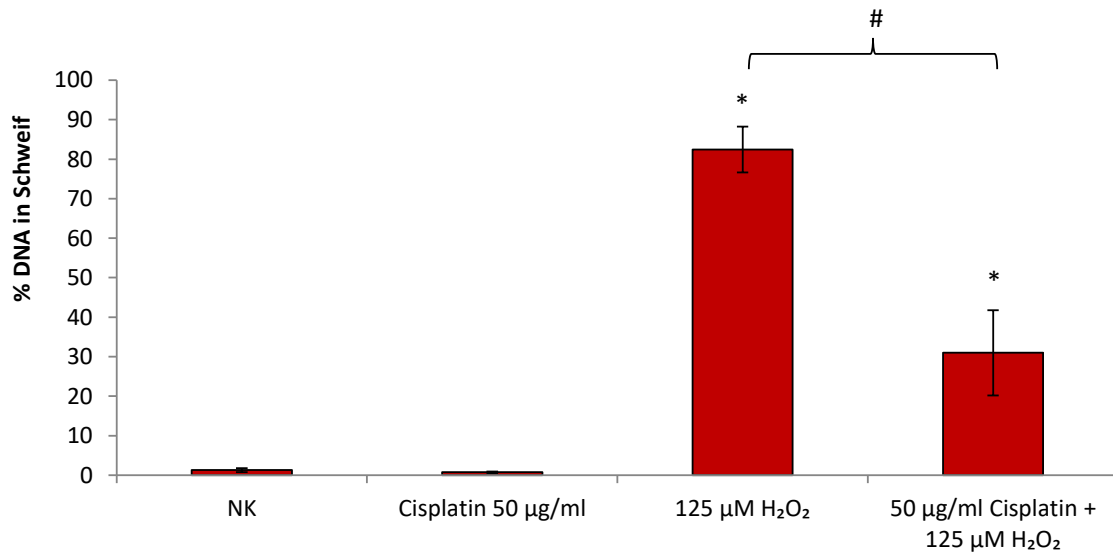


Abbildung 16: Comet-Assay - HT29 Hitzeexposition bei 42 °C mit/ohne 125 µM H₂O₂ und mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3, Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = $p \leq 0,05$ vs. NK, # = $p \leq 0,05$ - 125 µM H₂O₂ vs. Cisplatin 50 µg/ml + 125 µM H₂O₂, Mann Whitney U Test

Bei der Temperaturerhöhung auf 42 °C zeigte sich im Vergleich zu 37 °C oder auch 40 °C eine ähnliche Tendenz. Eine Signifikanz der 125 µM H₂O₂ Probe alleine als auch in Kombination mit Cisplatin war gegenüber der Negativkontrolle zu erkennen. Ebenfalls war eine signifikante Abnahme der prozentualen DNA im Schweif nach Kombination beider Reagenzien zu ermitteln, Cisplatin alleine zeigte wie bei 40 °C keine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrolle.

Bei allen Proben der verschiedenen Temperaturen wurde ebenfalls ein Vitalitätstest durchgeführt, wobei die Vitalität aller Zellen bei über 95 % lag und somit keine Zytotoxizität beobachtet wurde.

Um den Einfluss der Hyperthermie auf die Abnahme des DNA Schadens von H_2O_2 im Vergleich zur Kombination von H_2O_2 und Cisplatin besser darstellen zu können, wurden die Ergebnisse untereinander auf ihre Signifikanz untersucht. Dabei wurde die relative Abnahme der prozentualen DNA im Schweif bei H_2O_2 alleine gegenüber der Kombination von H_2O_2 mit Cisplatin verglichen. Dabei kam es zu einer relativen Abnahme bei 37 °C von 37,5 %, bei 40 °C von 28,5 % und bei 42 °C von 52,5 % im Vergleich von H_2O_2 alleine gegenüber der Kombination von H_2O_2 mit Cisplatin.

Dabei zeigte der Versuch die relative Abnahme gegenüber der Positivkontrolle durch die Kombination mit Cisplatin bei 40 °C im Vergleich zu 37 °C keine Signifikanz. Die Abnahme der 42 °C-Proben war im Vergleich zu den 40 °C-Proben ($p = 0,05$), als auch zu den 37 °C-Proben ($p = 0,046$) signifikant größer.

4.2.2 CaCo-2-Zelllinie

In Anlehnung zu den Versuchen mit HT29-Zellen wurden nach dem gleichen Protokoll die Versuche mit CaCo-2-Zellen durchgeführt. Ebenfalls eingesetzt wurden dabei die Konzentrationen von 50 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin und 125 μM H_2O_2 .

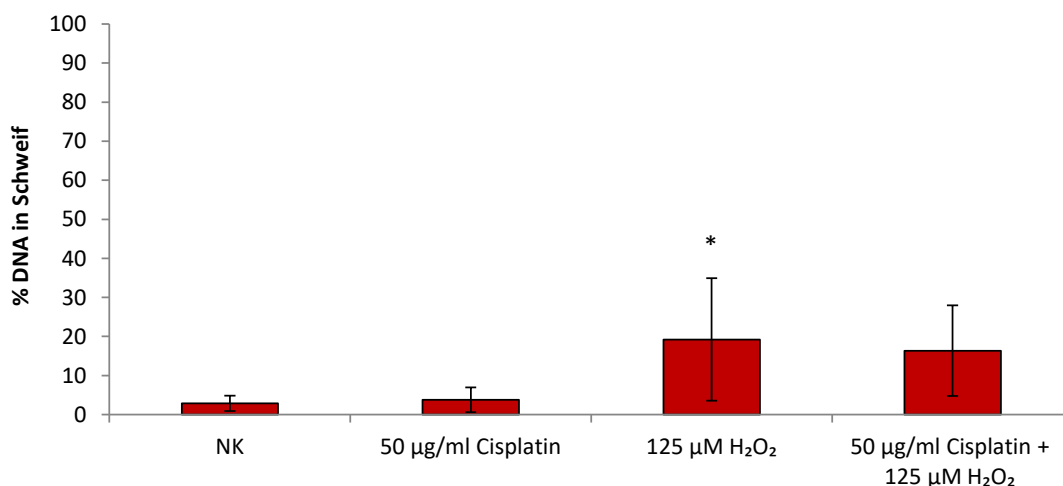


Abbildung 17: Comet-Assay – CaCo-2 Hitzeexposition bei 37 °C mit/ohne 125 μM H_2O_2 und mit/ohne 50 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin; $n=3$, Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = $p \leq 0,05$ vs. NK, Mann Whitney U Test

Die prozentuale DNA im Schweif war sowohl bei der Negativkontrolle als auch bei der Zugabe von Cisplatin unter 5 %. Die Behandlung mit der Positivkontrolle H₂O₂ zeigte einen signifikanten Anstieg des DNA-Schadens. Bei der Kombination von Cisplatin und H₂O₂ war der Schaden nicht signifikant verschieden von der alleinigen Behandlung mit H₂O₂, zeigte aber eine Tendenz zu geringeren Werten.

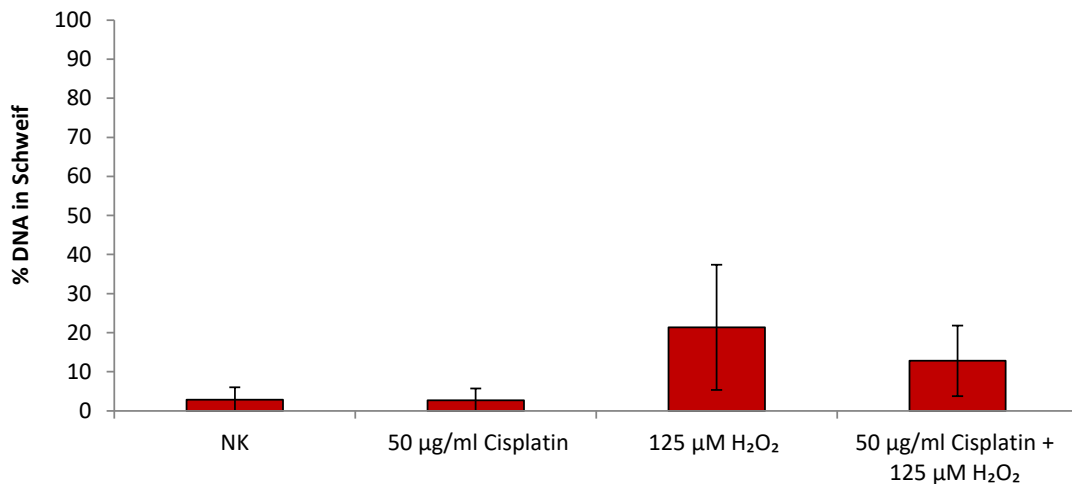


Abbildung 18: Comet-Assay – CaCo2 Hitzeexposition bei 40 °C mit/ohne 125 µM H₂O₂ und mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3, Mittelwert +/- Standardabweichungen

Eine ähnliche Tendenz wie bei der Behandlung der CaCo2-Zellen bei 37 °C, zeigte sich in den Versuchen bei 40 °C. Durch die recht hohen Standardabweichungen ließen sich jedoch keine Signifikanzen aufzeigen. Erneut war bei der Negativkontrolle als auch bei der Exposition mit Cisplatin alleine die prozentuale DNA im Schweif unter 5 %. Die Zugabe von H₂O₂ zeigte eine Erhöhung des DNA-Schadens, während die Kombination von H₂O₂ und Cisplatin einen niedrigeren Wert zeigte.

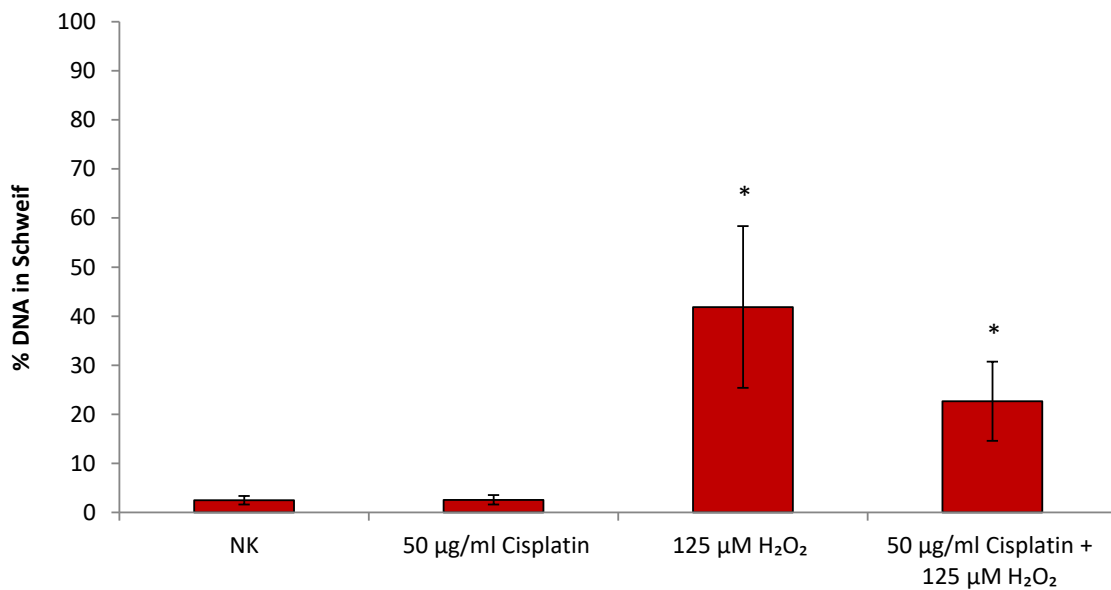


Abbildung 19: Comet-Assay – CaCo2 Hitzeexposition bei 42 °C mit/ohne 125 µM H₂O₂ und mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3, Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = p ≤ 0,05 vs. NK, Mann Whitney U Test

Wie bei den 37 °C und 40 °C Versuchen fielen die Expositionen bei 42 °C ähnlich aus. Die Behandlungen mit H₂O₂ alleine als auch in Kombination mit Cisplatin waren signifikant erhöht im Vergleich zur Negativkontrolle. Durch Zugabe von Cisplatin zu H₂O₂ wurde der DNA-Schaden signifikant vermindert.

Wie bei den HT29-Zellen wurde ebenfalls ein anschließender Vitalitätstest durchgeführt. Es konnte bei gleichzeitiger Zytotoxizitätsprüfung eine hohe Vitalität von circa 95 % bei allen Versuchen festgestellt werden.

Auch bei den CaCo2-Versuchen wurde die relative Abnahme der prozentualen DNA im Schweif bei H₂O₂ alleine gegenüber der Kombination von H₂O₂ mit Cisplatin statistisch verglichen. Dabei war die relative Abnahme bei 37 °C von circa 20 % auf ca. 80 %, bei 40 °C von circa 40,5 % auf 58,5 % und bei 42 °C von circa 47 % auf 53 %.

Die jeweilige Abnahme von H₂O₂ im Vergleich zu H₂O₂ mit Cisplatin wurde ebenfalls bei den verschiedenen Temperaturen statistisch untersucht. Es zeigte sich jedoch im Gegensatz zu den HT29-Zelllinie trotz Signifikanzen gegenüber dem Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle von 37 °C bei keinem der Versuche eine Signifikanz gegenüber der prozentualen Abnahme von 37 °C, 40 °C oder auch 42 °C, was wahrscheinlich an den relativ hohen Standardabweichungen lag.

4.3 Apoptosedetektion und Nachweis von oxidativem Stress mittels Durchflusszytometrie

Bei sämtlichen Versuchen mit der Durchflusszytometrie wurden HT29-Zellen verwendet. Bei Vorversuchen mittels Mikrokerntest wurde beobachtet, dass sich durch die 24-stündige Hitzebehandlung vermehrt adhärente Zellen vom Boden der Kulturflasche ablösen. Im Gegensatz zu normaler Zellkultur bei 37 °C waren diese im Überstand befindlichen Zellen jedoch vorwiegend vital (d.h. zeigten im Zytotoxizitätstest keine Färbung). Daher sollten diese Zellen nun ebenfalls in die Auswertung mit eingebunden werden. Zusätzlich zu den adhären Zellen im Zellpellet, wurden daher die im Überstand zu findenden Zellen getrennt ausgewertet.

Da die Temperaturerhöhung auf 40 °C im Comet-Assay keine signifikante Änderung gegenüber der 37 °C- Kontrolle ergeben hatte, wurden die Experimente zur Apoptose auf den Vergleich von 42 °C und 37 °C beschränkt.

4.3.1 Apoptosedetektion mittels Annexin-V-FLUOS Markierung

Annexin-V-FLUOS Markierung ist eine etablierte Methode um im Durchflusszytometer apoptotische Zellen zu detektieren.

Die Zellen wurden jeweils 24 Stunden inkubiert, danach abgelöst, gewaschen und mit Annexin-V-FLUOS behandelt und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet.

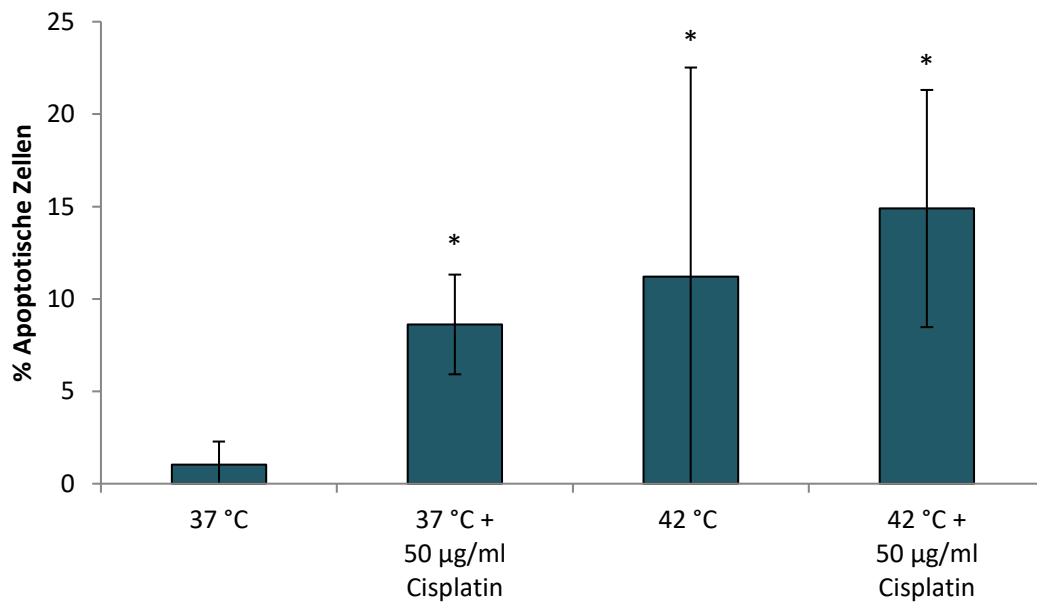


Abbildung 20 a: Durchflusszytometrie – Apoptosedetektion – HT29-Zellpellet, Hitzeexposition 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; Mittelwert mit Standardabweichung Lower Right; n=4 Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = $p \leq 0,05$ vs. NK, Mann Whitney U Test

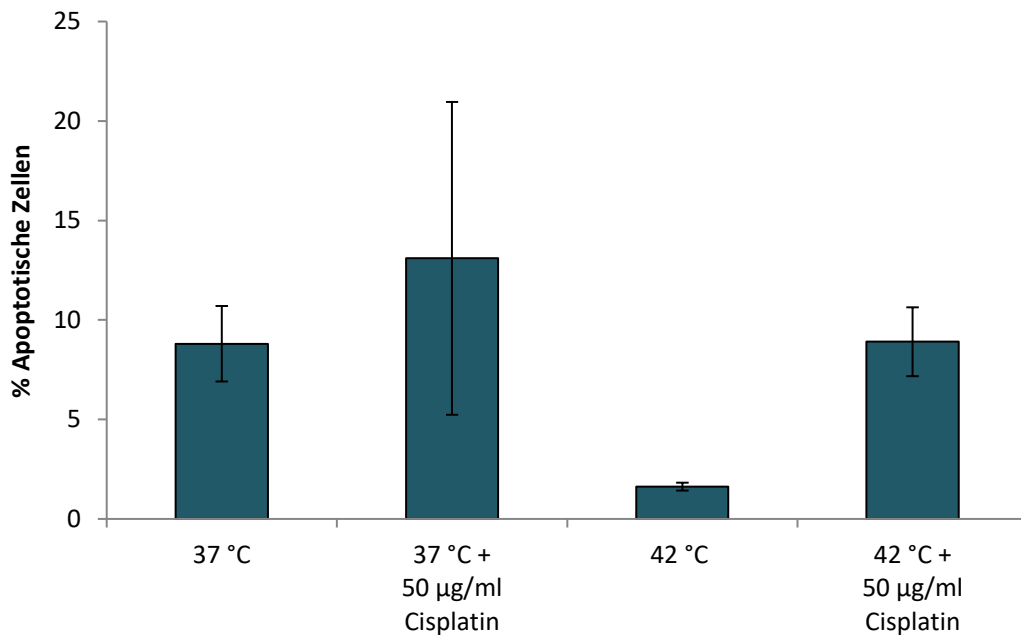


Abbildung 20 b: Durchflusszytometrie - Apoptosedetektion– HT29– Überstand, Hitzeexposition 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin, Mittelwert mit Standardabweichung Lower Right; n=3, Mittelwert +/- Standardabweichungen, Mann Whitney U Test

Bei den durchgeführten Versuchen mit HT29 Zellen zeigte sich im Zellpellet (Abbildung 20 a) bei 37 °C eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen bei Zugabe von Cisplatin (50 µg/ml). Die Temperatur von 42 °C alleine erhöhte diesen Wert nochmals. Die Kombination aus 42 °C und 50 µg/ml Cisplatin konnten ebenfalls eine nochmalige Verstärkung dieser Erhöhung zeigen. 37 °C mit Cisplatin, 42 °C und 42 °C mit Cisplatin konnten in der statistischen Auswertung eine Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle vorzeigen. Im Überstand (Abbildung 20 b) zeigte bereits die Negativkontrolle von 37 °C eine erhöhte Anzahl an Apoptosen, welche durch die Zugabe von Cisplatin noch verdeutlicht wurde. Bei 42 °C ließen sich jedoch fast keine Apoptosen nachweisen. Durch Kombination von Hitze und Cisplatin zeigte sich dann wieder eine Zunahme der Apoptoserate, welche etwa gleich hohe Werte wie die der Negativkontrolle aufzeigten.

4.3.2 Quantifizierung von oxidativem Stress mittels Messung des GSH-Gehaltes

Eine hohe Menge an intrazellulärem oxidativen Stress kann ebenfalls zum Zelluntergang führen. Die Messung des GSH-Gehalts hilft dabei indirekt, den oxidativen Stress innerhalb der Zelle zu messen.

Die Inkubationszeit der Zellen mit Cisplatin und 42 °C bei diesen Versuchen betrug 24 Stunden. Die Zellen des Zellpellets aus dem abgelösten Zellrasen (Abbildung 21), als auch die sich im Überstand befindenden Zellen, wurden nach Exposition mit Monochlorobiman (0,4 mM) versetzt und nach Inkubation im Durchflusszytometer gemessen. Parallel dazu wurde derselbe Versuchsverlauf mit 50 µM BSO, einem GSH-Neusynthese-Inhibitor durchgeführt.

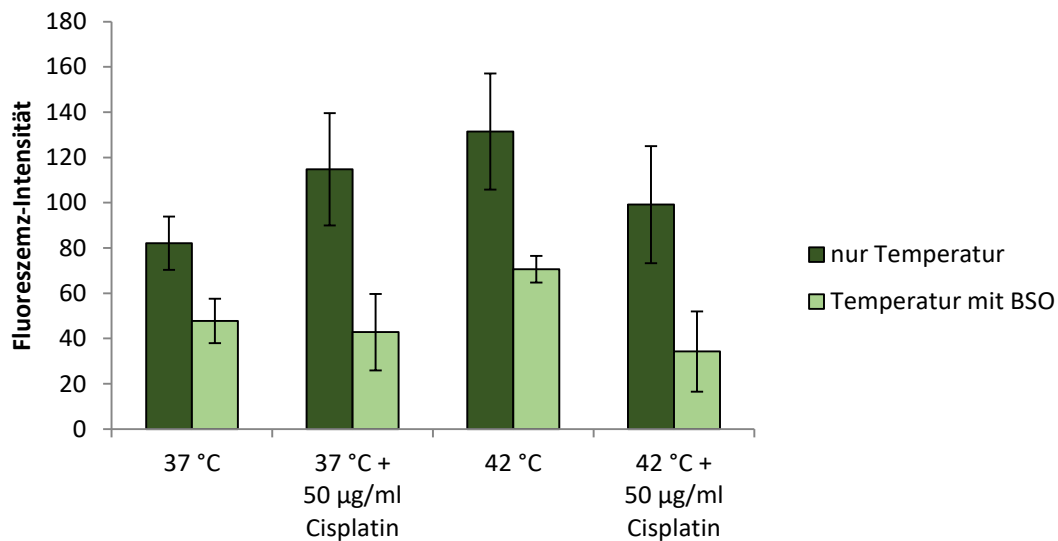


Abbildung 21: Durchflusszytometrie – Messung des oxidativer Stress mittels GSH-Gehalt - HT29 – Zellpellet, Hitzeexposition mit/ohne 50 µM BSO bei 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin, Mittelwert mit Standardabweichung; n=3

Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte die Zugabe von 50 µg/ml Cisplatin über einen Zeitraum von 24 Stunden einen deutlichen Anstieg des gemessenen oxidativen Stresses. Im Vergleich dazu war eine noch stärkere Zunahme der Werte bei einer Hitzeexposition über 42 °C erkennbar. Diese Tendenz zeigte sich in dem Versuchsansatz bei Zugabe von Cisplatin zur 42° C Behandlung nicht wieder, sondern der Wert verringerte sich, wobei sämtliche Änderungen nicht signifikant waren. Es konnte ein niedrigerer Wert wie bei den Ergebnissen mit 37 °C in Kombination mit 50 µg/ml Cisplatin erzielt werden.

Bei gleichzeitiger 24 stündiger Behandlung mit 50 μM BSO zeigte sich bei 37 °C in Kombination mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin ein leicht erniedrigter Wert wie bei der Negativkontrolle bei 37 °C. Die Erhitzung auf 42 °C unter paralleler Behandlung mit BSO zeigte nur eine geringe Zunahme des oxidativen Stresses, während die Kombination von 42 °C und Cisplatin mit BSO zu einem niedrigeren Wert ähnlich dem der Negativkontrolle führte. Auch hier war keine der Änderungen signifikant.

Im Vergleich zu den Versuchen ohne BSO, war insgesamt eine Abnahme des gemessenen Monochlorobiman und somit Zunahme des oxidativen Stresses in allen Versuchen feststellbar. Besonders deutlich war dies bei der Messung der 42 °C Proben mit und ohne BSO Behandlung. Bei Zugabe von 50 μM BSO kam es zu einer deutlichen Abnahme des Fluoreszenz-Intensität.

Es wurden ebenfalls, wie in den anderen Versuchen, die abgelösten Zellen im Überstand analysiert.

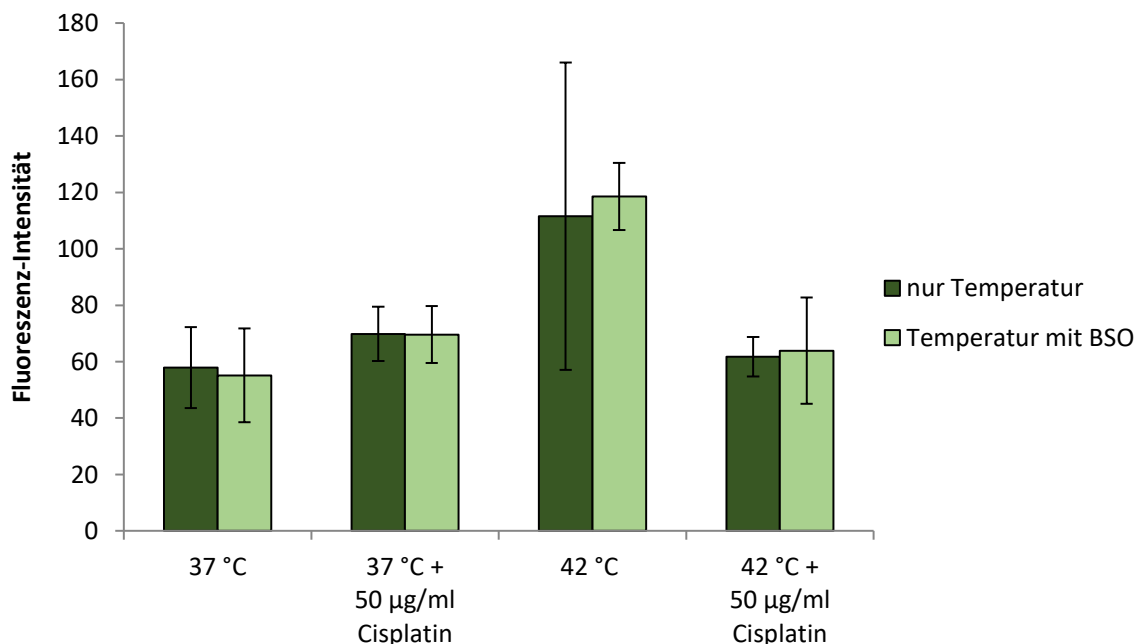


Abbildung 22: Durchflusszytometrie – Messung des oxidativer Stress mittels GSH-Gehalt- HT29 – Überstand, Hitzeexposition mit/ohne 50 μM BSO bei 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 $\mu\text{g/ml}$ Cisplatin, Mittelwert mit Standardabweichung; n=3

Auch die Proben des Überstandes mit den abgelösten Zellen wurden gleichermaßen einmal mit und einmal ohne BSO-Zugabe parallel im Durchflusszytometer analysiert. Hier zeigte sich kein Einfluss der BSO-Behandlung. Nur 42 °C, aber nicht Cisplatin alleine oder die Kombination, führten zu einem höheren zellulären GSH-Spiegel, was für den Ansatz mit BSO signifikant war. Ohne BSO war der Mittelwert ähnlich, aber die Erhöhung aufgrund großer Standardabweichung nicht signifikant.

Zusammenfassend war die Zunahme des GSH-Gehaltes in Proben der Zellpellets als auch des Überstandes durch Hyperthermie nachweisbar, die durch die Kombination mit Cisplatin reduziert oder verhindert wurde. Nach Zugabe von BSO, das den zellulären GSH-Spiegel senkte, zeigte sich vor allem bei den noch adhärenen Zellen eine Reduktion von GSH durch Cisplatin und wiederum eine Verhinderung des hitzeinduzierten GSH-Anstiegs.

4.3.3 Quantifizierung von oxidativem Stress mittels Messung des DCF-Gehalts

DCF wird aus DCF-DH durch intrazelluläre Oxidation gebildet und kann somit zur Detektion von oxidativem Stress mit Hilfe der Durchflußzytometrie herangezogen werden.

Nach 24 stündiger Inkubation wurden Proben aus dem Zellpellet (siehe Abbildung 23), sowie getrennt davon auch aus dem Überstand (Abbildung 24) hergestellt und nach der oben beschriebenen Methode behandelt und ausgewertet.

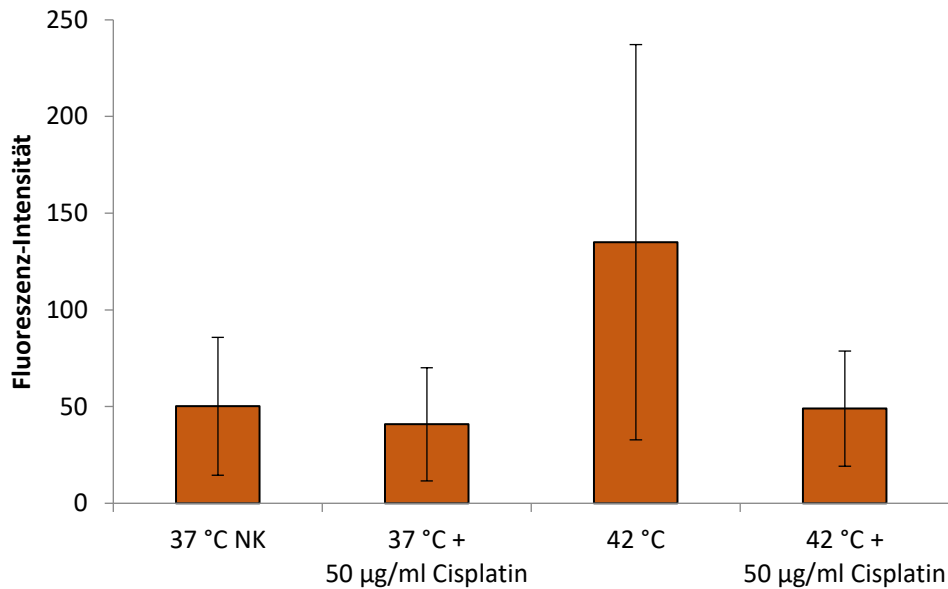


Abbildung 23: Durchflusszytometrie – Messung des oxidativen Stress mittels DCF Gehalts - HT29 – Zellpellet, Hitzeexposition bei 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin, Mittelwert mit Standardabweichung; n=3

Bei Messung des DCF-Gehalts der im Zellpellet befindlichen Zellen (Abbildung 23), bewirkte die Zugabe von Cisplatin im Vergleich zur Negativkontrolle ein geringes Absinken des oxidativen Stress. Die Behandlung mit 42 °C bewirkte eine Zunahme an Fluoreszenz-Intensität. Die Kombination von Hyperthermie und Zytostatikum erzielte einen ähnlichen Wert an Fluoreszenz-Intensität wie die Negativkontrolle, wobei die Veränderungen nicht signifikant waren. Generell war jedoch vor allem durch die hohen Standardabweichungen keine Signifikanz ermittelbar.

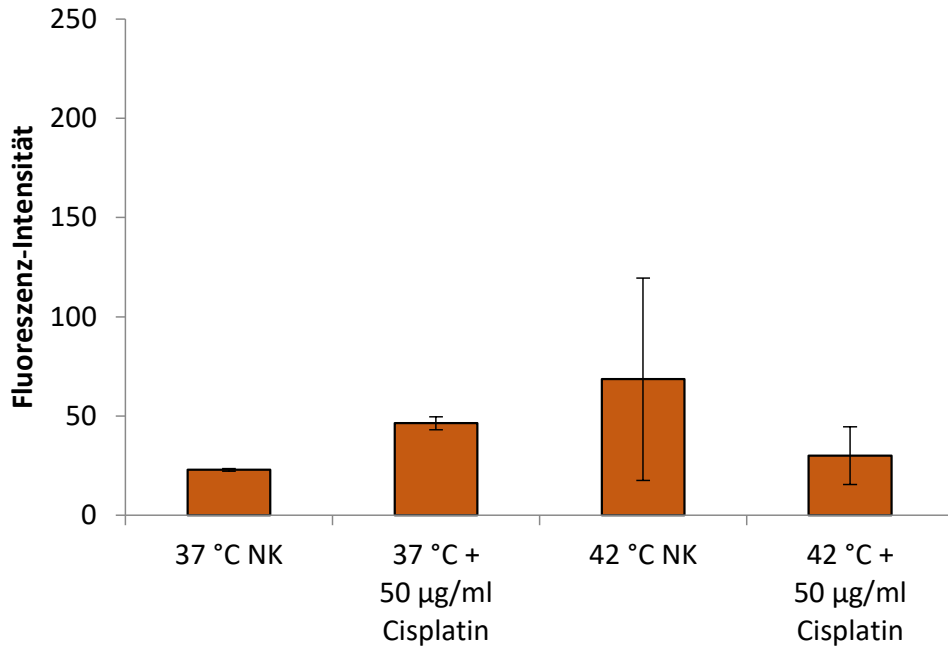


Abbildung 24: Durchflusszytometrie – Messung des oxidativen Stress mittels DCF Gehalts - HT29 –Überstand, Hitzeexposition bei 37 °C und 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin, n=2; Mittelwert +/- Standardabweichungen

In den abgelösten Zellen des Überstandes (Abbildung 24) war generell ein geringerer DCF-Gehalt im Vergleich zu den noch adhärenen Zellen (Abbildung 23) feststellbar. Die Zugabe von Cisplatin ergab im Vergleich zur Negativkontrolle eine Zunahme des oxidativen Stresses. Hyperthermie erzielte den höchsten Wert an Fluoreszenz-Intensität, während die Kombination von 42 °C und Cisplatin nur einen geringfügig höheren Wert als die Negativkontrolle darstellte. Auch hier waren die Veränderungen nicht signifikant.

Zusammenfassend detektierte die DCF-Durchflusszytometrie bei adhärenen, als auch abgelösten Zellproben, den höchsten Wert an oxidativem Stress bei der Behandlung mit Hyperthermie. Die Inkubation mit Hitze und Cisplatin wies keinen addierenden Effekt der Kombination aufweisen.

4.4 Vitalitätstest mittels Fluoresceindiacetat (FDA) und Gel Red

Vitalitätstests dienen dazu behandelte Proben auf ihre Anzahl an vitalen und nicht-vitalen Zellen hin zu untersuchen. Neben dem mit FDA und GelRed durchgeführten eigentlichen Vitalitätstest wurde auch die Gesamtzellzahl ermittelt.

Auch beim Vitalitätstest wurden die noch adhärennten Zellen von denen im Zellüberstand befindenden Zellen getrennt bewertet. Dies sollte auch die abgelösten Zellen in den Versuchsaufbau mit einschließen. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls 24 Stunden. Die folgende Abbildung (Abbildung 25) stellt die Ergebnisse der adhärennten Zellen dar.

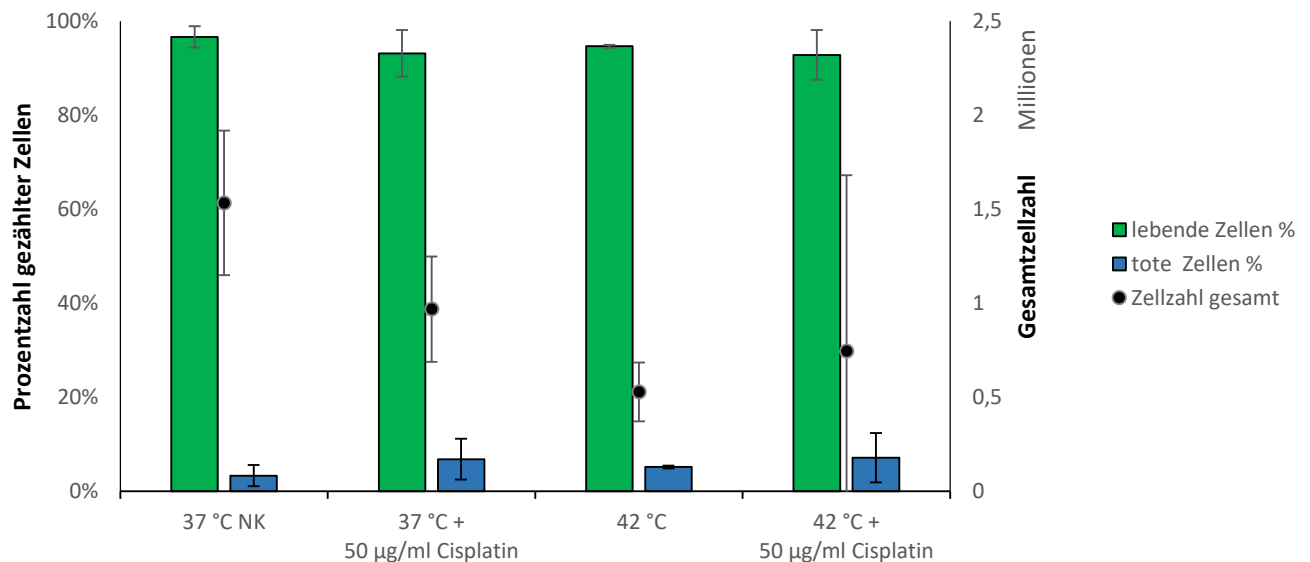


Abbildung 25: Vitalitätstest – HT29 – Zellpellet, Hitzeexposition 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3; Mittelwert +/- Standardabweichungen

Die Gesamtzellzahl bei den verschiedenen Versuchsansätzen zeigte die größten Veränderungen, während die Verteilung der gesamten Zellen im Vergleich von toten Zellen zu lebenden Zellen kaum einen Unterschied aufwies. Die Negativkontrolle bei 37 °C zeigte die höchste Gesamtzellzahl an, eine deutliche Abnahme in der Kombination von 37 °C mit 50 µg/ml Cisplatin war erkennbar. Die Behandlung mit 42 °C Grad verringerte diesen Wert nochmals. Eine gleichzeitige Exposition mit 42 °C und 50 µg/ml Cisplatin ergab jedoch einen kleinen Anstieg der Werte.

Die abgelösten Zellen des Überstandes zeigten folgende (Abbildung 26) dargestellte Werte.

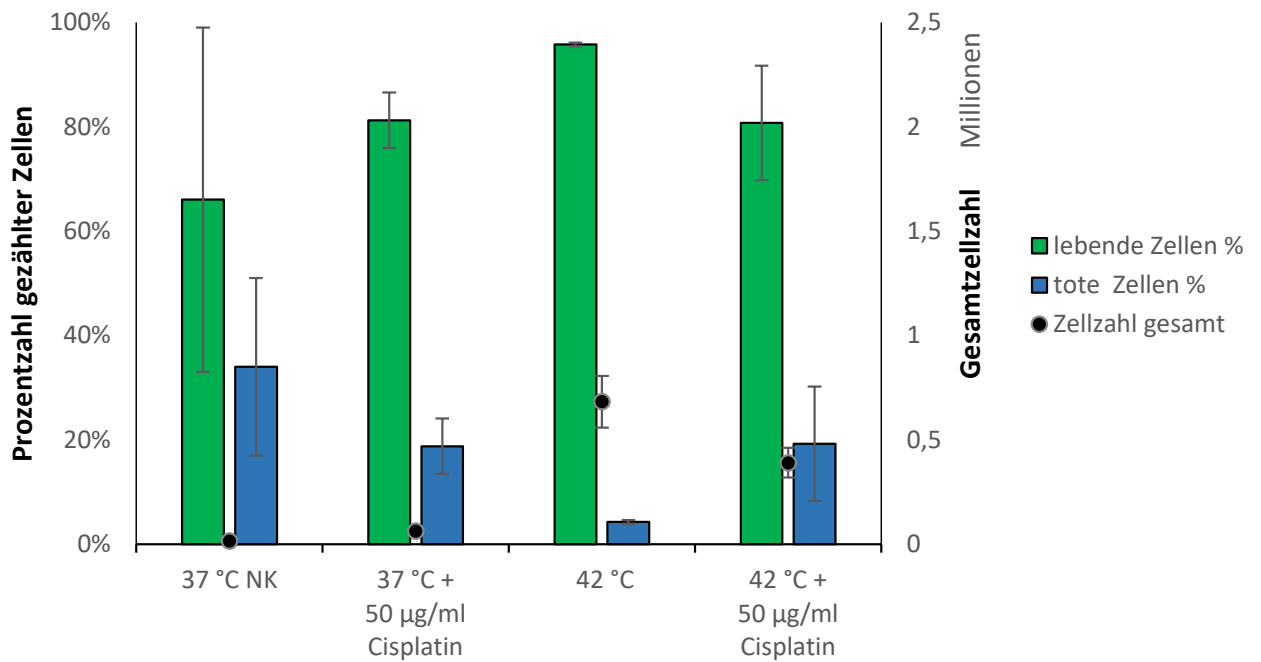


Abbildung 26: Vitalitätstest – HT29-Überstand, Hitzeexposition bei 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=2; Mittelwert +/- Standardabweichungen

Im Überstand der 37 °C Proben war eine sehr geringe Zellzahl zu finden, welche im Durchschnitt zu circa 35 % als rot erkennbar und somit als tote Zellen auszuwerten waren. Bei der Kombination von 37 °C und 50 µg/ml Cisplatin lösten sich ebenfalls nur wenige Zellen ab und waren im Überstand zu finden. Die Vitalität bei diesen lag bei durchschnittlich 80 %. Die meisten Zellen im Überstand zeigten die Proben bei 42 °C auf, die abgelösten Zellen zeigen jedoch im Vitalitätstest zu circa 90 % eine grüne Anfärbung, welche die Zellen als vital identifizierte. Bei gleichzeitiger Exposition mit 42 °C und 50 µg/ml Cisplatin war eine geringere Zellzahl erkennbar, wobei der Prozentsatz der apoptotischen Zellen sich erhöhte und auf demselben Niveau wie bei der Kombination von 37 °C und Cisplatin war. Bei n=2 war eine Testung auf Signifikanz nicht möglich.

Zusammenfassend war die Vitalität der adhärennten Zellen trotz der Behandlung mit Cisplatin, Hyperthermie und deren Kombination kaum beeinflusst. Die Zellzahl senkte sich bei Exposition mit dem Zytostatikum und der Hitze zunehmend ab. Zellen des Überstandes waren ebenfalls in ihrer Vitalität kaum beeinträchtigt, wobei hier die mit Hyperthermie behandelten Zellen die höchste Vitalität zeigten. Die Zellanzahl war bei den mit erhöhter Temperatur inkubierten Zellen im Überstand jedoch höher. Besonders ist zu betonen, dass somit unter der verwendeten Hyperthermie auch solche Zellen ihre Adhärenz verloren, die noch vital waren.

4.5 Zellzahlquantifizierung mittels Neubauerkammer und morphologische Auswertung mit Gel Green

Eine sehr einfache, jedoch sehr aussagekräftige Methode kann die Anfärbung der behandelten Zellen mit dem DNA Farbstoff Gel Green darstellen. Dieser färbt den Zellkern in fluoreszierendem grün-gelblichen Farbton an und ermöglicht dadurch eine morphologische Betrachtung der Zellen im Mikroskop. Quantitativ ist die Zellzahl mittels Zählung per Neubauerkammer gut zu ermitteln.

Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert, während sie bei 37 °C oder einer Temperatur von 42 °C mit oder ohne 50 µg/ml Cisplatin exponiert wurden. Die Gesamtzellzahl wurde mittels Neubauerkammer ermittelt, im Anschluss daran wurden die Zellen morphologisch in solche mit kondensiertem Chromatin (Apoptose-ähnlich) und solche mit normaler Kernmorphologie unterteilt.

Die dargestellte Abbildung (Abbildung 27) und mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 28 a-d) zeigen die erhobenen Ergebnisse: Die Zellzahl, durch die Neubauerkammer ermittelt, zeigt eine Effektsättigung, d.h. sowohl Cisplatin alleine als auch Hitze alleine ermöglichte kaum eine Zellvermehrung (gegenüber der Anfangszellzahl von 0,5 Millionen Zellen vor Behandlungsbeginn) im Beobachtungszeitraum. Ein additiver Effekt der Kombination war nicht klar zu erkennen (kein signifikanter Unterschied zu Cisplatin bzw. 42 °C alleine) und wäre nur detektierbar gewesen, wenn zusätzlich zur behinderten Proliferation auch ein Zelltod stattgefunden hätte.

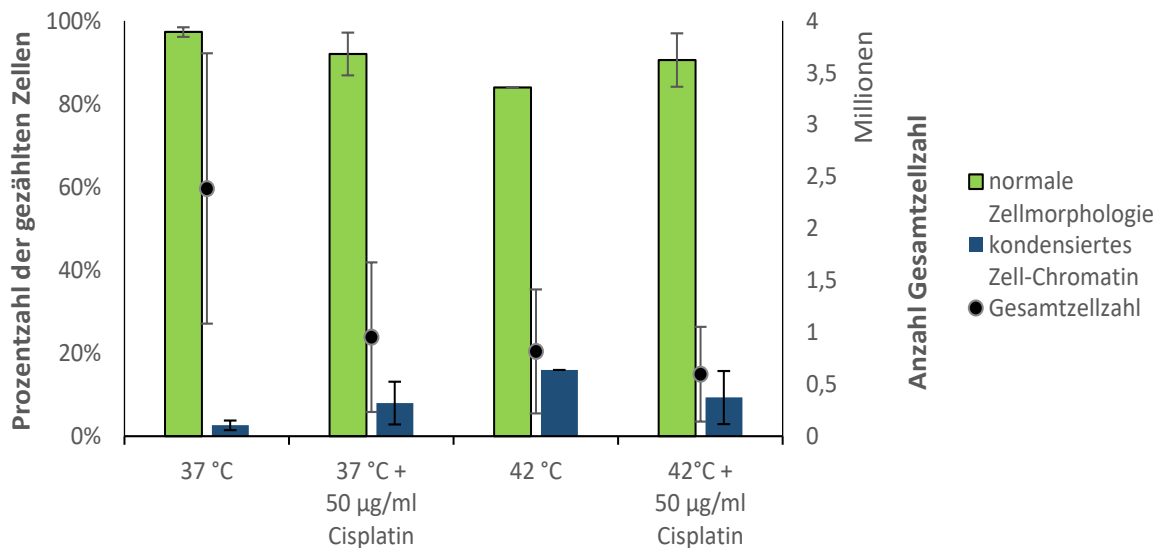


Abbildung 27: Zellzahlbestimmung mit Neubauerkammer – HT29-Zellpellet; n=3; Mittelwert +/- Standardabweichungen

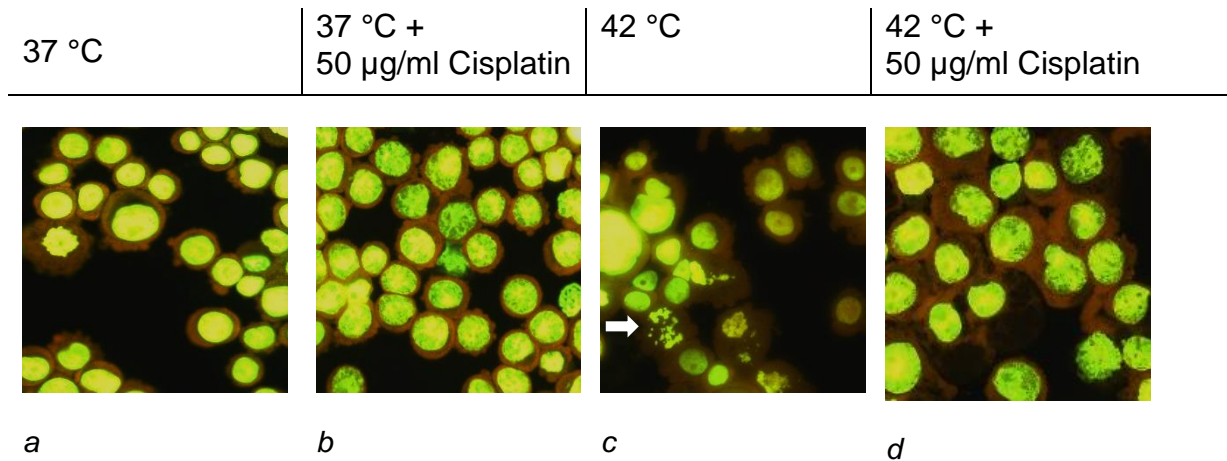


Abbildung 28 a-d: Mikroskopische Aufnahmen der mit Cisplatin (50 µg/ml; b,d) und/oder Hyperthermie (42 °C; c,d) behandelten HT29-Zellpellet-Proben und morphologische Auswertung, Anfärbung mit Gel Green, Inkubationsdauer 24 Stunden; n=3; Pfeil in Bild 3c: Markierung zeigt eine Zelle mit kondensiertem Chromatin

Die ermittelte Zellzahl, durch Trypananfärbung in der Neubauerkammer ermittelt, (Abbildung 27) sank zunehmend bei Exposition mit 37 °C und Cisplatin, 42 °C und 42 °C mit Cisplatin ab und lag bei den Versuchen nur noch zwischen 0,8 und 0,5 Millionen Zellen. Nach Hitzebehandlung wurden vermehrt Zellen mit kondensiertem Chromatin detektiert. Cisplatin alleine sowie die Kombinationsbehandlung führte zu gering erhöhten Frequenzen solcher Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

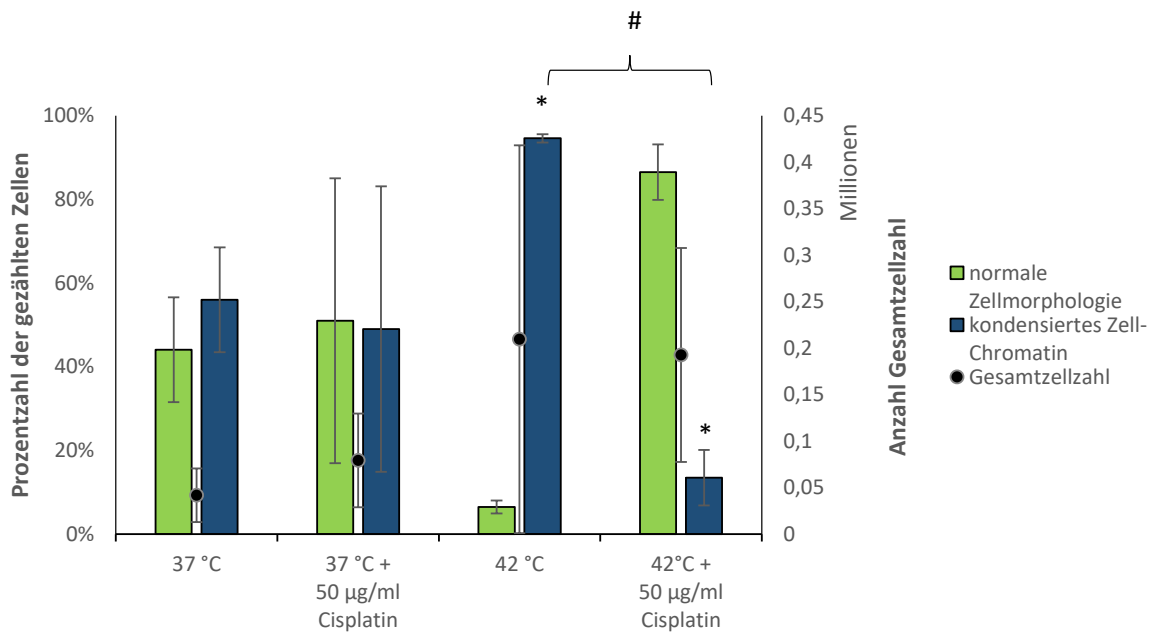


Abbildung 29: Zellzahlbestimmung mit Neubauerkammer – HT29-Zellen im Überstand, n=3; Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = $p \leq 0,05$ vs. NK, # = $p \leq 0,05$ vs. NK Mann Whitney U Test

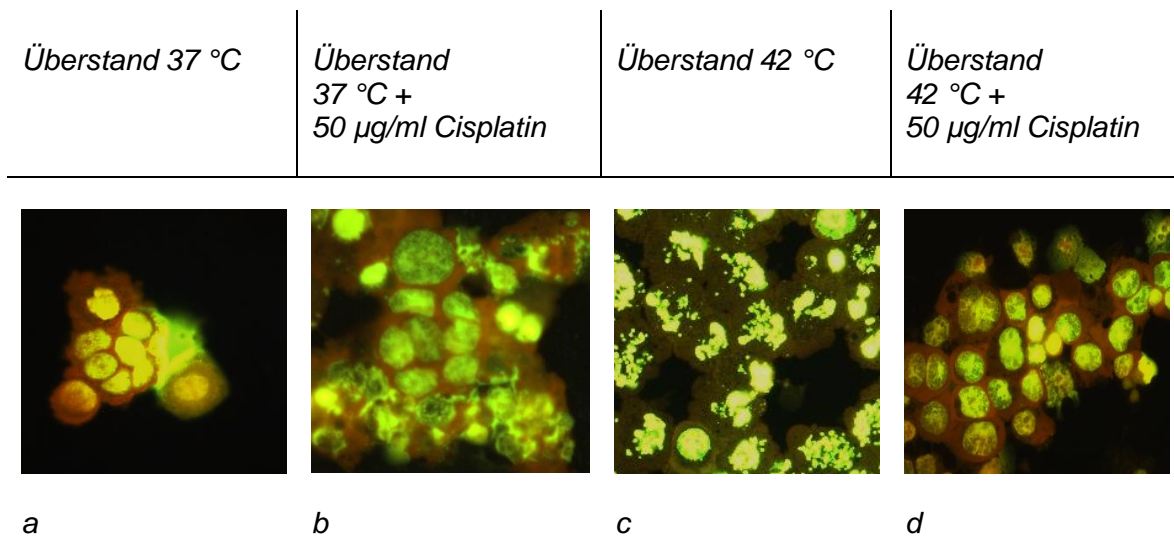


Abbildung 30 a-d: Mikroskopische Aufnahmen der mit Cisplatin (50 µg/ml; b, d) und/oder Hyperthermie (42 °C; c, d) behandelten HT29-Zellen im Überstand und morphologische Auswertung, Anfärbung mit Gel Green, Inkubationsdauer 24 Stunden, n=3

Die Zellzahl der im Überstand analysierten Zellen (Abbildung 29) lag bei den 37 °C und 37 °C mit Cisplatin Proben bei circa 50'000 und 100'000 Zellen. In dem Überstand der Proben mit 42 °C und 42 °C mit Cisplatin, zeigten sich erhöhte Werte der Zellzahl zwischen 150'000 und 200'000. Im Überstand der Negativkontrolle zeigten circa 40 % der Zellen normale Kernmorphologie, während der Großteil (circa 55 %) kondensiertes Chromatin aufwies. Bei der Behandlung mit Cisplatin (37 °C) gehörte jeweils die Hälfte der Zellenanzahl entweder der normalen Morphologie oder der der kondensierten Zellchromatin an. Die Zellen im Überstand des 42 °C Versuchs wiesen zu fast 95 % kondensiertes Chromatin auf. Bei der Kombination von 42 °C und Cisplatin zeigte sich fast ein umgekehrtes Bild, zu über 80 % zeigten die Zellkerne eine normale Morphologie. Vermutlich verhinderte Cisplatin, dass die Zellen die hitzeinduzierte Morphologieänderung vollziehen konnten.

Der Überstand der mit 42 °C Grad exponierten Zellen zeigte fast ausschließlich Zellen mit stark kondensiertem Chromatin. Diese Morphologie erinnert stark an mitotische Zellen, die dann in diesem Zellstadium zugrunde gegangen wären. Neben den vielen Zellen mit kondensiertem Chromatin waren einige wenige vitale Zellen erkennbar.

5 Diskussion

Die Kombination von Temperaturerhöhung mit Zytostatika wird in der klinischen Praxis zur lokalen Therapie unter anderem von Peritonealkarzinomen verwendet. Die genauen *in vitro* Abläufe innerhalb der behandelten Tumorzellen sind jedoch nicht bekannt.

Diese Arbeit sollte untersuchen ob und in welchem Umfang additive Effekte der Kombination von Hyperthermie mit dem Zytostatikum Cisplatin *in vitro* in Tumorzellen detektiert werden können und ob daraus Rückschlüsse auf die Wirkmechanismen der Kombination *in vitro* gezogen werden können.

5.1 Gentoxizitätstests

5.1.1 Auswahl geeigneter Versuchszelllinie basierend auf der Mikrokerninduktion durch Hyperthermie

Bei den Ausgangsversuchen zu Beginn der Arbeit sollte geklärt werden, welche Zelllinien für die weitere Versuchsplanung geeignet sind. Dafür wurden Tumorzelllinien aus Geweben verwendet, die als Ursprung eines Peritonealkarzinoms vorkommen können. Dies sind die Zelllinien HCT116 und HT29, welche kolorektalen Karzinomen entstammen, und CaCo-2, welche aus einem kolorektalen Adenokarzinom etabliert wurden. HaCat Zellen – humane Keratinozyten - wurden als im Labor gut untersuchte Vergleichszelllinie verwendet, die Eigenschaften ähnlich nicht-transformierter Primärzellen aufweist. Der Mikrokerntest als etablierte Methode zum Nachweis der Gentoxizität von Substanzen diene als erster Untersuchungsansatz.

Eine Temperatur von 42 °C entspricht der klinischen Verwendung der HIPEC-Therapie (Kuijpers et al. 2013; Brücher et al. 2012) am ehestem und auch in den *in vitro* Versuchen des Mikrokerntests führte sie zu den eindeutigeren Ergebnissen im Vergleich zu 40°C. Dabei erschienen die CaCo-2 Zellen bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden wesentlich hitzesensibler als die HT29 Zellen. Die Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte bei im Vorfeld durchgeführten Vorversuchen am deutlichsten eine Erhöhung der Mikrokernfrequenz.

Es konnte nachgewiesen werden, dass CaCo-2 Zellen im Vergleich zu allen anderen getesteten Zellen am hitzeempfindlichsten reagierten und hohe Apoptoseraten zeigten, wobei auch HT29 Zellen bei Hyperthermie eine Mikrokernbildung aufwiesen. Dass CaCo-2-Zellen im Vergleich zu anderen Tumorzellen sensibler auf Hitze reagierten, wurde auch schon 2009 von Gosslau beobachtet (Gosslau et al. 2009). HT29 Zellen reagierten in der beschriebenen Literatur im Gegensatz dazu bei Hitzeinduktion vor allem mit synergistisch stärkerem Effekt bei Zugabe von anderen Stoffen (Wang et al. 2007; Shchepotin et al. 1997), wobei andere Testmethoden verwendet wurden.

5.1.2 Auswirkungen von Cisplatin auf die Mikrokernfrequenz

In den Vorversuchen mit Cisplatin bei CaCo-2 und HT29 Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass dieses Mikrokerne induziert. Diese Erkenntnis ist schon seit längerem in der Literatur bekannt (Duffaud et al. 1998; Kliesch et Adler 1987) und begründet die Tatsache, dass es als Positivkontrolle bei Gentoxizitätsversuchen verwendet wurde (Kliesch et Adler 1987).

Die Verwendung des Zytostatikums Cisplatin hatte auf die Proliferation jedoch im Alleinversuch keine Auswirkungen. Zunehmende Konzentrationen zeigten jedoch eine erhöhte Mikrokernbildung und auch eine höhere Apoptoserate bei HT29-Zellen und CaCo-2-Zellen auf. Dies könnte damit erklärt werden, dass Cisplatin die DNA im Zellkern durch Quervernetzung beeinflusst und auch mit steigender Konzentration zu vermehrten Genomschäden führt, jedoch das Teilungsverhalten der Zelle nicht beeinflussen kann und somit der Proliferationsindex nicht verändert wird. Die Kombination von Hyperthermie und Zytostatikum zeigte keine eindeutigen Ergebnisse bei allen Zelllinien. Die verschiedenen Zellcharakteristika scheinen somit einen erheblichen Einfluss auf die Wirkungsstärke von Hyperthermie und Cisplatin in Kombination oder in isolierter Anwendung zu spielen.

Eine generelle Zunahme der Mikrokerne und somit des Genomschadens bei der Kombination von Cisplatin mit Hyperthermie konnten bei den Vorversuchen bei HT29-Zellen im Gegensatz zu CaCo-2-Zellen nachgewiesen werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Hitzesensibilität der CaCo-2-Zellen dazu führt, dass diese direkt apoptotisch werden und es zu keiner Proliferation und somit Mikrokernbildung kommen kann. Im Gegensatz dazu scheinen HT29-Zellen weniger anfällig gegenüber Hitze zu sein, führen ihre Proliferation fort und können somit weiter Mikrokerne ausgebildet.

5.1.3 Untersuchung des Mikrokerninduktionswegs

Dass durch Hyperthermie Mikrokerne induziert werden können, ist seit der Untersuchung von Zellen nach Radiotherapie in der Tumorbehandlung bekannt, (Rofstad et al. 1984) und wurde auch in neueren Publikationen immer wieder belegt (Hintzsche et al. 2012b; Hintzsche et al. 2012a).

Die Betrachtung des Induktionsweges von Mikrokernen bei HT29-Zellen durch Zugabe von VAS und Tempol sollte nun dazu führen, eine Einsicht in die Mikrokerninduktion von Hyperthermie zu erhalten.

Oxidativer Stress kann zu Schädigung von zellulären Makromolekülen führen und entsteht durch eine Dysbalance zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen, welche durch freie Radikale ausgelöst werden. Dabei kann oxidativer Stress zu chronischen Entzündungen führen, welche ihrerseits wiederum eine Rolle in der Entstehung von chronischen Erkrankungen spielen; unter anderem auch von Krebs, Diabetes, kardiovaskulären, neurologischen und pulmonalen Erkrankungen (Reuter et al. 2010).

Tempol ist ein Antioxidanz und Radikalfänger, der in Zell- und Tierversuchen häufig verwendet wird, um die Rolle von oxidativem Stress unter anderem bei der Tumorentstehung zu untersuchen (Schubert et al. 2004).

NADPH-Oxidase ist eine wichtige Quelle für die Entstehung von sogenannten reaktiven Sauerstoff-Spezies (englisch: reactive oxygen species, ROS), welche eine Rolle bei der Entstehung des oxidativen Stresses spielen. VAS ist ein spezifischer NADPH-Oxidase-Inhibitor, der die Entwicklung dieser für die Zelle schädlichen reaktiver Sauerstoffspezies inhibiert und somit den Organismus vor ihrer gefährlichen Reaktivität schützt (Gatto et al. 2013).

Die Idee hinter dem Einsatz von Tempol und VAS war, dass falls Mikrokerne durch den Einfluss von oxidativem Stress gebildet werden, diese bei Zugabe der Reagenzien vermindert oder gar nicht mehr gebildet würden. Die erzielten Ergebnisse konnten diese Theorie jedoch nicht unterstützen, da durch Zugabe von VAS oder auch Tempol die Mikrokernbildung eher anstieg, als dass sie sich verminderte.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass ein anderer Mechanismus bei der Behandlung mit Hyperthermie die Bildung der Mikrokerne indiziert und der oxidative Stress eine geringere Rolle dabei spielt.

Welche genaue Funktion Hyperthermie bei der Mikrokernbildung jedoch spielt, ist bisher nicht gänzlich geklärt. Ein Zusammenhang mit Hitzeschockproteinen wird jedoch diskutiert (Hintzsche et al. 2012b).

5.1.4 Beeinflussung des Ergebnis durch verschiedene Passagenhöhe

Durch den Vergleich von Zellen in unterschiedlicher Passage wurde gezeigt, dass allein die Dauer der Zellkultur zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Veränderung verschiedener Zellcharakteristika zurückzuführen und wird in der Literatur für andere Zelllinien bereits erwähnt (Liévin-Le Moal et Servin 2013; Chang-Liu et Woloschak 1997).

Dieser Effekt der Kulturdauer wird vor allem auf die genetische Instabilität in Tumorzellen zurückgeführt (Lengauer et al. 1997). Dies führt vor Augen, dass die verwendeten Zelllinien in der Versuchsreihe möglichst immer in denselben oder ähnlichen Passagenzahlen verwendet werden sollten, da Morphologie, Adhärenz und auch Teilungsverhalten sich mit zunehmender Passagenanzahl verändern und sich somit auf die Versuchsergebnisse auswirken kann.

5.2 Comet Assay

Die Erwartung beim Versuchsaufbau des Comet-Assays war, dass die Kombination von Cisplatin mit der Erhöhung der Temperatur, also Hyperthermie, zu einer stärkeren Reduktion der durch H_2O_2 induzierten DNA-Schädigung, als die Behandlung bei Normothermie führt. Dies wäre darauf zurückzuführen, dass die quervernetzende Aktivität von Cisplatin, die die Ausbildung eines „Cometenschweifs“ behindern sollte, durch Hitze unterstützt würde. Orsolíc et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass es durch Hyperthermie zu einer besseren intrazellulären Aufnahme von Cisplatin über die Membranen kommt (Oršolić et al. 2013) und es zudem die Interkalation von Cisplatin in die DNA durch Veränderung chromosomaler Proteine begünstigt (Tomasovic et al. 1978).

H_2O_2 wird als Positivkontrolle beim Comet-Assay verwendet, da es bei ansteigender Konzentration zu Schweifbildung führt. Dabei ist H_2O_2 ein typisches Zwischenprodukt bei der Bildung von oxidativen Stress. Es induziert bewiesenermaßen DNA Schäden und führt somit auch zur Mutagenese (Fairbairn et al. 1995a; Imlay et al. 1988). Es kommt dabei zur Bildung von OH-Radikalen, welche für die DNA-Schädigung und Läsionen verantwortlich sind (Martins et al. 1991). Ob Hyperthermie ebenfalls den oxidativem Stress in der Zelle erhöht, und somit einen additiven Effekt bei diesem Versuchsaufbau hätte, wird kontrovers diskutiert (Chen et al. 2008; Wang et al. 2007; Skibba et al. 1991).

Auf Grund der chemischen Eigenschaften von Cisplatin ist davon auszugehen, dass sich eine DNA-Quervernetzung nachweisen lassen müsste. Hintergrund ist, dass Cisplatin aufgrund seiner hohen Elektrophilie bevorzugt mit dem N7-Atom von Guanin und Adenin in der DNA reagiert. Dabei entstehen Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Stranges, sogenannte Intrastrang-Quervernetzung und zwischen benachbarten DNA-Strängen; auch Interstrang-Quervernetzungen genannt (Apostolou et al. 2014; Reedijk et Lohman 1985).

In den durchgeführten Versuchen ließ sich darstellen, dass sowohl die HT29-Zellen, als auch CaCo-2-Zellen sehr gut auf die Cisplatinexposition ansprachen. Es zeigte sich, dass durch die Bildung von DNA-Addukten durch Cisplatin unter den gewählten Bedingungen keine messbare eigene DNA-Schädigung hervorgebracht wurden, jedoch ein Rückgang des durch H₂O₂ induzierten DNA-Schadens durch die Cisplatinbehandlung induziert wurde.

Die parallel durchgeführten Vitalitätstests bewiesen durch die stets hohen Vitalitätparameter, dass die im Comet Assay gemessenen Ergebnisse überwiegend auf die direkten Substanzwirkungen an der DNA zurückzuführen waren, und nicht etwa auf indirekte Toxizitätsbedingte DNA-degradierende Effekte.

Die Ergebnisse bei den HT29-Zellen zeigten zudem eine signifikant größere Abnahme des DNA-Schweifs durch Cisplatinzugabe bei den 42 °C-Versuchen zu den 37 °C, als auch den 40 °C-Versuchen im Vergleich zu der Positivkontrolle mit alleiniger Behandlung mit H₂O₂. Dies könnte auf eine intensiviertere Adduktbildung bei 42 °C zurückzuführen sein.

Bei CaCo-2 Zellen waren vergleichbare Trends zu beobachten, allerdings waren die temperaturbedingten Unterschiede nicht signifikant voneinander verschieden.

In einer Arbeit von 1986 konnte bereits gezeigt werden, dass durch Hyperthermiebehandlung ein intrazellulärer Cisplatin-Anstieg beobachtet werden konnte (Wallner et al. 1986). Es konnte außerdem in einer späteren Arbeit gezeigt werden, dass Cisplatin bei Temperaturen von bis zu 45 °C mehr Quervernetzung intrazellulär bildet, als reguläre Normothermie alleine (Halamikova et al. 2007).

Nach der Cisplatinexposition werden vor allem in der Behandlungspause von 4 Stunden DNA-Addukte intrazellulär gebildet. Bei circa sechs Stunden nach einer Cisplatinexposition lag das Maximum der intrazellulären Aufnahme in einer Arbeit, die V79 Chinesische Hamsterzellen nutzte (Olive et Banath 2009). Hier wurde mit den gewählten 4 Stunden ein guter Effekt in HT29 Zellen induziert, es blieb jedoch nachzuprüfen, ob mit einer längeren Dauer eventuell auch mit CaCo-2 Zellen signifikante Temperatureffekte auftreten würden.

Die erzielten Ergebnisse mit dem Comet-Assay zur Untersuchung der Cisplatin-induzierten DNA-Quervernetzung in Kombination mit Hyperthermie konnten bei Verwendung von HT29 als auch CaCo2-Zellen als eindeutige Ergebnisse gewertet werden. Sowohl Negativkontrolle als auch Positivkontrolle zeigten die bereits bekannten Auswirkungen auf die Schweifbildung. Cisplatin in der Einzelbehandlung, als bekannter Crosslinker, induzierte keine vermehrte Schweifbildung. Die Kombination von der H₂O₂-Positivkontrolle mit Cisplatin zeigte bei 37 °C, 40 °C und 42 °C jedoch eine Reduzierung der DNA-Strangbrüche in beiden Zelllinien, wobei die Abnahme bei der HT29-Zelllinie signifikant war.

Bei der Kombination von H₂O₂ mit Cisplatin wäre nun anzunehmen, dass durch die Quervernetzung der DNA und der Wirkung von Cisplatin, die Schweifbildung im Comet-Assay abnehmen würde. Das Hinzufügen der Hyperthermie sollte dabei zusätzlich untersuchen, ob die Temperatur die Versuchsergebnisse beeinflusst. Bei gleichzeitiger Behandlung von H₂O₂ mit Cisplatin konnte bei HT29-Zellen eine signifikante Verminderung der DNA-Strangbrüche bei 42 °C aufgezeigt werden, während bei CaCo-2-Zellen eine Verminderung ebenfalls sichtbar würde, jedoch nicht im Signifikanzbereich.

Eine Interpretationsmöglichkeit dafür ist, dass verschiedene Tumorzellen verschiedenartig auf Cisplatin reagieren. So konnte in einer Übersichtsarbeit über den Comet-Assay gezeigt werden, dass Cisplatin sich nicht auf alle Tumorzellen im gleichen Maße auswirkt. Es konnte sogar dargestellt werden, dass eine Cisplatinbehandlung bei einer resistenten Zelllinie eines ursprünglichen Kolonkarzinom sogar komplett unwirksam war (Apostolou et al. 2014).

5.3 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie sollten die Zellen auf Apoptosen (Annexin-V-FLUOS Markierung) und oxidativen Stress (DCF, GSH) untersucht werden.

Der Nachweis von apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-FLUOS Färbung ist eine häufig in der Literatur genutzte und recht gut standardisierte Methode, Zellen nach *in vitro* Behandlung auf Apoptose und Nekrosen zu untersuchen (van Engeland et al. 1998; van Engeland et al. 1996).

Auch oxidativer Stress kann als Mediator zu Apoptose führen (Buttke et Sandstrom 1994). Das Zytostatikum Cisplatin kann bei der Bildung von oxidativem Stress eine Rolle spielen (Masuda et al. 1994). Welche Auswirkungen die Anwendung von Hyperthermie bei der Bildung von oxidativem Stress spielt, wird in der Literatur nicht übereinstimmend aufgeführt (Chen et al. 2008; Skibba et al. 1991). Hyperthermie kann jedoch nach Chen. et al. die Wirkung von oxidativem Stress verstärken und führt zu vermehrtem Zelluntergang, welcher durch Autophagie und nicht durch Apoptose den Zelltod einleitet (Chen et al. 2008; Wang et al. 2007).

Bei den vorherigen Methoden (Mikrokerntest, Comet-Assay) wurde zunehmend auffällig, dass sich bei Inkubation mit Hyperthermie vermehrt adhärente Zellen vom Zellrasen ablösen und im Überstand vorzufinden waren. Diese Zellen wurden in den vorherigen Versuchsmethoden mit den adhären Zellen abzentrifugiert und mit diesen zusammen als ganzheitliche Probe betrachtet. Diese Zellen im Überstand wurden in den folgenden Versuchen nun getrennt von den Zellen des Zellrasens analysiert und als separate Proben ausgewertet.

5.3.1 Kein Nachweis von gesteigertem oxidativem Stress bei Kombination von Hyperthermie und Cisplatin

Der oxidative Stress wurde mittels GSH- und DCF-Messung im Durchflusszytometer untersucht.

2',7'-Dichlorofluorescein-diacetat (DCFH-DA) ist eine Substanz, die bei Auftreten von intrazellulärem oxidativen Stress durch die Hydrogenperoxidase zu DCF oxidiert und dadurch durch die Durchflusszytometrie messbar gemacht wird (Wang et Joseph 1999; Keston et Brandt 1965).

Auch die Messung des zellulären GSH-Gehalts dient zur Quantifizierung von oxidativem Stress, da es durch Bildung von Radikalen in der Zelle zur Oxidation von GSH kommt und somit dessen Gehalt sinkt (Rice et al. 1986). Nach längerer Behandlung sind allerdings manche Zellen auch in der Lage, als eine Gegenreaktion zur Abwehr des oxidativen Stresses den GSH-Gehalt zu erhöhen.

Generell zeigten sowohl adhärente Zellen als auch Zellen des Überstandes bei beiden Versuchsmethoden ähnliche Ergebnisse. Zellen, die mit Hyperthermie alleine behandelt wurden, erzielten dabei die höchsten Werte. Zellen, die mit Cisplatin behandelt wurden, zeigten nur eine geringere Zunahme des oxidativen Stresses. Ein additiver Effekt der beiden Behandlungsmethoden konnte bei Kombination jedoch nicht erzielt werden.

Auch durch die Zugabe von BSO bei der GSH-Messung, als selektiver Hemmer der γ -Glutamylcystein-Synthase und somit Hemmer der Glutathion-Synthase (Drew et Miners 1984; Griffith et Meister 1979), der Zellen empfindlicher für oxidativen Stress macht, konnte eine vermehrte Bildung des oxidativen Stresses durch Hyperthermie und Cisplatinbehandlung nicht nachwiesen werden.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass durch die Kombination von Cisplatin mit Hitze ein gegenläufiger Effekt parallel induziert wird. Hitze verursacht durch Aktivierung des ROS Systems (Kokura et al. 2016) eine Steigerung der Gegenregulation (GSH-Produktion), welche dann jedoch durch Cisplatin depletiert werden könnte. Dies ist damit zu erklären, dass die freien SH-Gruppen von Cisplatin das Antioxidans Glutathion (GSH) elektrophil angreifen können. Nach der Reaktion mit GSH werden die GSH-Platin-Komplexe durch eine ATP-abhängige Exportpumpe aus der Zelle befördert (Ishikawa et al. 1994). Somit wird ein Addukt aus GSH und Cisplatin aktiv vermehrt aus der Zelle transportiert (Galluzzi et al. 2012), und daher ist eine vermehrte Produktion von GSH in der Zelle womöglich nicht nachweisbar. Außerdem kann eine erhöhte Konzentration von GSH, welche durch Hyperthermie gebildet werden könnte, die Cisplatin-Moleküle abfangen, bevor sie mit der DNA reagieren können.

Insgesamt war es nicht möglich, bei der Kombination von Cisplatin mit Hyperthermie vermehrten oxidativen Stress nachzuweisen. Eine Exposition der Zellen mit Hyperthermie führte jedoch eindeutig zu einer Steigerung des oxidativen Stresses, während Cisplatin alleine nur eine sehr geringe Erhöhung bewirkte.

Hyperthermie induziert oxidativen Stress innerhalb einer Zelle (Kokura et al. 2016). Dies könnte neben vielen anderen intrazellulären Effekten auch darauf zurückzuführen sein, dass es zu einer pH-Wert-Veränderung in der Zelle kommt (Hildebrandt 2002; Streffer 1985) und somit ein verändertes Redoxgleichgewicht auftritt, was wiederum zu vermehrtem oxidativen Stress führt. Ähnliches beschreibt bereits Davidson et al. (Davidson et al. 1996) in seiner Arbeit mit Hefezellen. Cisplatin dagegen scheint auf Basis der in der Arbeit aufgeführten Ergebnisse weniger Einfluss auf die direkte Bildung von oxidativem Stress zu haben. Dies steht im Gegensatz zu einigen publizierten Arbeiten, welche Auswirkungen von Cisplatin auf die mitochondriale DNA beschreiben, wodurch es ebenfalls zur vermehrten Bildung von oxidativem Stress kommt (Marullo et al. 2013; Martins et al. 2008). Die in dieser Arbeit erzielten Daten können diese These jedoch nicht belegen und stehen im Gegensatz dazu.

Nach den hier aufgeführten Ergebnissen verursacht jedoch nicht der oxidative Stress den Zelluntergang alleine, sondern könnte vielleicht nur einen apoptotischen Zusatzeffekt darstellen.

5.3.2 Wenige Apoptosen bei abgelösten mit Hyperthermie behandelten Zellen

Mit den Versuchen zur Apoptosedetektion mittels Annexin-FLUOS Markierung gelang es erstmals, die Wirkung von Hyperthermie in Kombination mit Cisplatin gegenüber den anderen Versuchsansätzen als überlegen nachzuweisen. Die adhärennten Zellen zeigten vermehrte Apoptosen bei Zugabe von Cisplatin, noch höhere bei Behandlung mit 42 °C und höchste Werte bei der Kombination von Cisplatin mit Hyperthermie.

Die gleichzeitige Untersuchung des Überstandes ergab jedoch ein anderes Bild. Die durch die Behandlung abgelösten Zellen zeigten bei 37 °C in Kombination mit Cisplatin die größte Anzahl an apoptotischen Zellen. Die synchrone Verwendung von Hyperthermie und Cisplatin wies gleich hohe Daten auf wie die Negativkontrolle, während die alleinige 42 °C Behandlung die geringste Häufigkeit an apoptotischen Zellen aufwies.

Ein Nachweis von Apoptosen mittels Durchflusszytometrie bei mit Cisplatin behandelten Tumorzellen (Arany et al. 2004; Boersma et al. 1996) wurde bereits häufiger beschrieben. Boersma et al. beschrieb ebenfalls die getrennte Untersuchung von noch adhären, im Zellmedium schwimmenden, Zellen. Es wurde dabei hervorgehoben, dass das Vorhandensein einer intakten Zellmembran mit nach außen zeigendem Phosphatidylserin zur Detektion von Apoptosen mittels Annexin-V-FLUOS benötigt wird (Vermees et al. 2000; Boersma et al. 1996).

Generell wurde angenommen, dass abgelöste im Zellmedium schwimmende Zellen sich morphologisch verändert haben müssen und wohl eher als apoptotische Zellen zu erwarten wären. Die Ergebnisse dieser Versuche verneinen jedoch eine solche Annahme. Die mit 42 °C behandelten abgelösten Zellen zeigten eine größere Frequenz von Zellen auf, die im Vitalitätstest keinen Farbstoff aufnahmen als diejenigen Zellen, die gar nicht behandelt wurden und auch als sämtlicher adhären Zellen im direkten Vergleich.

Möglicherweise regulieren bei Anwendung von Hyperthermie in Tumorzellen auch gegenregulatorische Heat-shock-Proteine (HSP) eine Zellmembran-Stabilisierung und verhindern Schlüsselfunktionen im regulierten Zelluntergang (Beere 2001). Somit ermöglichen diese HSPs gegebenenfalls ein Überleben der Tumorzelle unter Konditionen welche ansonsten zu einem regulierten Zelltod führen würde. Es wird zudem in neueren Publikationen berichtet, dass HSP 70 zunehmend in der Zellmembran von Zellen detektiert werden kann und somit zelluläre Prozesse nach außen hin abschirmt und somit auf die Zellmembranen stabilierend wirkt (Sherman et Multhoff 2007).

Eine andere Erklärung wäre, dass die mit Hyperthermie behandelten und abgelösten Zellen ihre Zellmembran verändert haben müssen und kein Phosphatidylserin auf dem Zelläußeren vorzufinden ist. Somit konnten mittels der Behandlung mit Annexin-V-FLUOS auch keine Apoptosen detektiert werden. Hyperthermie an sich hat neben vielerlei Wirkungen auf den Zellorganismus (Overgaard 1977) auch Auswirkungen auf Proteine in der Zellmembran. Einige Enzyme in der Zellmembran, sogenannte Flippasen z.B. Scramblase, welche für die Umkehrung von Phosphatidylserin von der inneren Membran zur äußeren verantwortlich ist, sind hitzesensibel (Zwaal et al. 2005). Diese könnten somit in ihrer Funktion beeinträchtigt sein und damit würde die Methode der Apoptosedetektion mittels Annexin-V-FLUOS Markierung funktionslos werden. Welcher zelluläre Zustand nun tatsächlich geherrscht, vorallem bei den Ergebnissen der Kombination von Hitze und Cisplatin, ließ sich nicht vollständig mit den hier eingesetzten Methoden aufklären.

Eine Annexin Positivität von Tumorzellen, welche möglicherweise in eine mitotic catastrophe eingehen (Erklärung siehe im weiteren Verlauf der Diskussion), wurde in verschiedenen Publikationen beschrieben. Man nimmt an, dass mitotic catastrophe als ein onkosupressiver Mechanismus wirkt, der genomische Instabilität verhindert (Vitale et al. 2011). Eine eindeutige Detektion von Zellen, welche sich in der mitotic catastrophe befinden, ist in der Literatur erst in einer Zeitspanne von frühestens 24 Stunden bis maximal 120 Stunden nach Exposition beschrieben (Fabbri et al. 2008; Ngan et al. 2008). Somit wäre ein längerer Beobachtungszeitraum für zukünftige Versuchsansätze notwendig, um eindeutige Ergebnisse zu erhalten.

5.4 Hohe Vitalität trotz Behandlung mit Hyperthermie und Cisplatin

Mittels einer weiteren Methode zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit nach Exposition wurden die Proben mit dem Vitalitätstest untersucht. Gel Red prüft dabei die Membranintegrität durch eine rote Anfärbung der DNA nach Eindringen des Farbstoffs bei geschädigter Membran. Als positiver Marker dient die Spaltung von FDA durch aktive Esterasen, woraus eine grüne Fluoreszenz im Zytoplasma vitaler Zellen entsteht.

Die Ergebnisse des Vitalitätstests können in Anbetracht der vorher erzielten Ergebnisse nicht erklärt werden. Die adhärenen Zellen zeigen in dieser Methode trotz der unterschiedlichen Behandlung eine fast identische Vitalität (90-95 %) auf. Die Exposition mit Testsubstanzen wäre somit völlig wirkungslos geblieben. Die abgelösten Zellen der behandelten Proben zeigten ebenfalls eine hohe Vitalität (80-95 %), nur die Negativkontrolle wies die meisten toten Zellen auf. Nach diesen Ergebnissen würden alle Proben, egal mit welcher Behandlung, kaum in ihrer Vitalität beeinflusst werden. Wobei zu erwähnen ist, dass frühe apoptotische Zellen noch eine dichte Zellmembran und somit möglicherweise ebenfalls noch aktive Esterasen besitzen. Der hier durchgeführte Vitalitätstest ist damit eher zur Detektion von Nekrosen als von Apoptose geeignet.

Ein ähnliches Phänomen von anhaltender Vitalität beschrieben Pavlik et al (Pavlik et al. 1985), die ebenfalls die Esteraseaktivität in Tumorzellen untersuchten und zeigen konnten, dass eine Propidium Iodid-Negativität, als auch eine bestehende Esteraseaktivität, trotz antitumorale Therapie erhalten blieb. Ein anderer Interpretationsansatz wäre, dass Gel Red durch spezifische hitzebedingte Veränderung der Zellmembran (wie oben diskutiert) in eventuell apoptotische Zellen nicht eindringen kann und diese somit nicht rot markiert werden können.

Die Auszählung der Zellzahl der adhärenen Zellen zeigte auf, dass bei der Kombination von Cisplatin und Hyperthermie weniger adhärenen Zellen vorzufinden waren. Dazu passend waren die Zellzahlen des Überstandes. Zellen der Proben mit 42 °C zeigten in der Probe der adhärenen Zellen den niedrigsten Wert und den höchsten im Überstand. Bei Zugabe von Cisplatin wurde dieser Effekt leicht verringert.

Mit Hyperthermie behandelte Zellen lösten sich am häufigsten ab. Auch diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich die Zellmembran der durch Hitze behandelten Zellen veränderte. *In-vitro* benötigen Zellen ein bestimmtes Umgebungsmilieu an Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid um kultiviert werden zu können. Hyperthermie induziert eine Abnahme des Sauerstoffgehaltes in Flüssigkeiten (Tromans 1998). Es könnte daher wiederum in den mit Hyperthermie behandelten Proben zu einer leichten Hypoxie gekommen sein. Hypoxie ist erfahrungsmäßig ein Auslöser von Zellablösung bei adhären Zellen. Dabei werden die Adhäsionsmoleküle in der Zellmembran verringert, wobei die Zellvitalität nicht beeinflusst wird (Hasan et al. 1998). Ein ähnliches Phänomen könnte sich auch bei den behandelten Proben abgespielt haben, wobei diese These nicht beantwortet warum bei Kombination von Hyperthermie und Cisplatin eine geringere Zellablösung vorzufinden ist.

5.5 Detektion von Zellmembranläsionen bei hyperthermisch behandelten Zellen

Nach den Ergebnissen der Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie und des Vitalitätstest wurden die Proben per Neubauerkammer und Trypanfärbung quantifiziert und die Anzahl der toten und vitalen Zellen ausgezählt.

Die Anfärbung mittels Trypanblau ergab, dass die Proben der adhären Zellen mit Cisplatin (37 °C+Cisplatin, 42 °C+Cisplatin) eine ähnlich hohe Vitalität aufwiesen, während die alleine mit Hyperthermie behandelten Zellen mehr nicht vitale Zellen im Gesamtvergleich zeigten. Die durch Neubauerkammer ermittelte Gesamtzellzahl veranschaulichte, dass bei Zugabe von Cisplatin, Behandlung mit 42 °C und auch der Kombination zunehmend weniger Zellen im Zellrasen vorzufinden waren. Diese Ergebnisse zeigten somit ähnliche Werte wie die des vorherigen Vitalitätstest. Trypanblau färbt nur Zellen an, deren Zellmembran beschädigt ist (Schrek, 1936). Die Annahme, dass sich die Zellmembran der Zellen verändert haben könnte, wird durch diesen Versuch weiter unterstützt.

In der Analyse der Zellen des Überstandes überraschte bei der Anfärbung, dass Proben bei 42 °C in hoher Anzahl nicht-vital erschienen, während Zellen mit Hyperthermie und Cisplatin behandelt im Vergleich zu allen Ergebnissen die beste Vitalität aufwiesen. Es war nun anzunehmen, dass nur die alleine mit Hyperthermie behandelten abgelösten Zellen einen Membrandefekt aufwiesen und somit als nicht vitale Zellen zu werten waren. Cisplatin als Inter- und Intrastrangvernetzer der DNA beeinflusst anscheinend potentiell nicht die Zellmembran und hat sogar einen möglicherweise schützenden Effekt vor Zellmembranläsionen durch Hyperthermie.

5.6 Induktion einer ‚mitotic catastrophe‘ durch Hyperthermie

Die nach Cytospin erfolgten fotografischen Aufnahmen mittels Mikroskop unter Gel Green Färbung konnten dieses Bild der vorherigen Auszählung bestätigen.

Die Zellkerne der mit Cisplatin behandelten Zellen bei 37 °C und ebenso bei der Kombination mit 42 °C schienen kleiner, dichter und beinhalteten leicht ungleichmäßig angefärbte Bereiche im Zellnukleus. Diese ungleichmäßig angefärbten Bereiche könnten als Inter- und Intrastrang Vernetzungen des Cisplatins interpretiert werden, da diese nur bei mit Cisplatin behandelten Präparaten auftraten und die Unfähigkeit einer gleichmäßigen Anfärbung mit Gel Green darstellen. Eine weitere Interpretation wäre, dass es sich bei diesen Aussparungen der Anfärbungen um durch Cisplatin induzierte Vakuolen eines Autophagie Prozesses des Zelluntergangs handelte (Yang et al. 2008). Bei den 42 °C Proben konnten neben normalen Zellen außerdem vermehrt mitoseartige Zellen erkannt werden. Diese zeigten zerstörte Zellstrukturen auf, welche ähnlich wie sogenannte „apoptotic bodies“ aussahen.

Ein ähnliches Bild zeigte sich in den Zellen des Überstandes. Es fiel jedoch auf, dass die Zellen, welche mit Cisplatin behandelt waren, vermehrt eine ungleichmäßigere Zell- und Zellkernstruktur aufwiesen. Zellen im Überstand der 42 °C Proben zeigten fast gänzlich die Form von Mitosen, welche zugrunde gegangen waren und fielen mit zerbrochenem Zellkern in Form von Chromosomenstücken im Zytoplasma verteilt auf. Diese Zellen scheinen nicht mehr vital und auch nicht lebens- bzw. teilungsfähig.

Die Mikroskopiebilder belegen, dass die Ergebnisse der Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie und des Vitalitätstest im Gegensatz zu den späteren Versuchen stehen und daher kritisch hinterfragt werden müssen. Warum diese beiden Methoden den tatsächlichen Zustand der Zellen nicht widerspiegeln können bleibt unbeantwortet. Die bereits diskutierten Interpretationsmöglichkeiten müssen noch näher untersucht werden. Zusammenfassend kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sowohl zu einer Abänderung der Zellmembran (siehe 5.3.2) als auch zu einer intrazellulären Enzymveränderung (siehe 5.4) gekommen sein muss.

Die abgebildeten Zellen bei 42 °C im Überstand, befinden sich nach der hier aufgestellten These, in einer mitotic catastrophe, welche durch die Hitze induziert wird. Die exakte Definition des Begriffs mitotic catastrophe wird kontrovers diskutiert. Es handelt sich dabei um einen Zelltod der während der Mitose stattfindet und eine typische Zellmorphologie mit diffuser Chromosomverteilung im Zytoplasma aufweist. Bei den aufgeführten Versuchen scheinen die Zellen durch Hyperthermie vermehrt in der Mitose aufzulaufen, dort zu arretieren und dann im Zelluntergang abzusterben. Vor allem die abgelösten Zellen befinden sich fast vollständig in diesem Stadium. Der Zelluntergang während der Mitose, also die mitotic catastrophe, ist damit zu erklären, dass Zellen in der Mitose besonders hitzesensibel sind (Streffer 1985) und die Ausbildung des Spindelapparats durch die Hitze gestört wird (Coss et al. 1982). Die mitotic catastrophe wurde erstmalig von Timonem im Jahre 1950 beschrieben (Timonem et Therman E. 1950).

Ein mitotischer Zelluntergang, durch Hitze induziert beschrieben bereits 1988 Mackey *et al.* (Mackey et al. 1988) und Molz 1989 (Molz et al. 1989). In den darauffolgenden Jahrzehnten wurde immer wieder der Zusammenhang von Hyperthermie mit dem Hervorrufen einer mitotic catastrophe veranschaulicht (Erenpreisa et al. 2000; Ianzini et Mackey 1998).

Der Zelluntergang bei Cisplatin (Swift et al. 2016) oder auch bei Oxaliplatin (Ngan et al. 2008) wird auf verschiedenen Wegen beschrieben. Dabei wird auch die Detektion von einer mitotic catastrophe bei der Behandlung mit Cisplatin oder auch Oxaliplatin aufgeführt (Ngan et al. 2008; Vakifahmetoglu et al. 2008). Im Gegensatz dazu sind in den hier aufgeführten Ergebnissen die allein mit Cisplatin behandelten Zellen nicht durch eine chromatin-kondensierte Zellstruktur und somit mitotic catastrophe auffällig geworden. Es wird somit davon ausgegangen, dass vor allem Hyperthermie eine Induktion der mitotic catastrophe hervorruft. Ob die Induktion eines Zelluntergangs durch mitotic catastrophe, nun durch ein Platin-haltiges Zytostatikum im weiteren Verlauf nach Hitzebehandlung zusätzlich verstärkend wirkt, bleibt somit Bestandteil von zukünftigen Forschungsprojekten.

5.7 Zellzyklusarrest bei Cisplatin-behandelten Zellen

Zellen der hier dargestellten Versuche, bei denen Cisplatin in der Kombination hinzugegeben wurde, zeigen morphologisch zwischen 37 °C und 42 °C keinen auffälligen Unterschied. Auffällig ist, dass die Zellen keinerlei Mitosen aufzeigen und es den Anschein hat, dass diese in der G1- bzw. G2-Phase des Zellzyklus arretieren. Ein Arrest in der G1 oder vor allem in G2-Phase/Mitose durch Cisplatin wurde bereits in etlichen Publikationen dargestellt. Zusätzlich wurde beschrieben, dass es ebenfalls zu einem Proliferationsabbruch der Zellen bei Cisplatin-Behandlung kam (Swift et al. 2016; Qu et al. 2013; Mueller et al. 2006; Shapiro et al. 1999; Shi et al. 1994; Barry et al. 1990).

Hyperthermie hat neben vielen intrazellulären Auswirkungen auch Folgen für die verschiedenen Zellphasen durch Schädigung und Beeinträchtigung der Zentromere und kann dadurch eine mitotic catastrophe hervorrufen (Kokura et al. 2016; Nakahata et al. 2002). Nakahata et al. beschreibt außerdem, dass vor allem maligne Zellen durch Hyperthermie in der Mitose auflaufen, während normale nichtpathologische Zellen in der G1 oder G2-Phase verharren. Durch Cisplatin können G2-arretierte Zellen jedoch nicht die Mitose erreichen und folglich auch nicht in eine mitotic catastrophe eintreten.

Ein weiterer Aspekt der zu nennen ist, ist die Tatsache, dass vermutlich die in der G2-Phase arretierten Zellen zu einem späteren Zeitpunkt außerhalb des in der Arbeit aufgeführten Beobachtungszeitraums von 24 Stunden, ebenfalls in die Apoptose eintreten können. Verschiedene Publikationen von Real-Time Monitoring-Versuchen mit Cisplatin beschreiben, dass es bei verschiedenen Zelltypen zu zeitlichen Unterschieden im Ablauf des Apoptoseweges kommt (Baek et al. 2016; Alborzinia et al. 2011). Somit wäre ein additiver Effekt hinsichtlich des Endpunktes eines gewollten Zelltods durchaus denkbar, falls die Annahme richtig ist, dass Zellen welche sich in der mitotic catastrophe befinden, ebenfalls nicht überlebensfähig sind. Für die weiteren Analysen dieser Vermutung wären jedoch zeitabhängige Analysen über den hier gewählten Zeitraum hinaus erforderlich.

Welche Rolle die Kombination von Hyperthermie und Cisplatin als Auswirkung im Vergleich zu den einzelnen Behandlungen hat, konnte durch die Versuche nicht spezifisch nachgewiesen werden. Ob durch Hyperthermie die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle z.B. durch den Ctr-1 Transporter verstärkt wird (Landon et al. 2013) oder andere Abläufe die klinische bereits evaluierten Effekte von Hyperthermie in Kombinationen mit Zytostatika verbessern, ist durch die hier aufgeführten Ergebnisse und mittels unserer gewählten Methoden nicht eindeutig nachweisbar.

5.8 Ausblick

Um die Hypothese über die Induktion einer mitotic catastrophe und den Zellzyklusarrest zu verifizieren, sollten nun weitere Methoden zur Zellzyklusanalyse und/oder Real-Time Monitoring durchgeführt werden. Dabei sollten neben den einzelnen Stadien auch Substrate bzw. Marker untersucht werden; z.B. Cyclin-dependent Kinase (CDK) oder Caspase 3, welche in der Regulation des Zellzyklus, aber auch im Zelluntergang beteiligt und vorzufinden sind (Kimura et al. 2013; Vermeulen et al. 2003). Die Durchführung von Western-Blot Versuchen mit Untersuchung von Caspasen wurde hierzu ins Auge gefasst. Auch sollte dabei auf den Zusammenhang von Hitzeschockproteinen (Hsp27, Hsp90) und p53-Protein eingegangen werden (Hildebrandt 2002; Hettinga et al. 1996), welche bei der Apoptoseinduktion eine Rolle spielen (Takayama et al. 2003). Ein vermehrter Zusammenhang zwischen der HIPEC-Therapie und Hitzeschock-Proteinen wird mit klinischen Studien zunehmend belegt (Zunino et al. 2016; Kepenekian et al. 2013; Pelz, Joerg O W et al. 2013). Somit sollte dieser Endpunkt als weiterer Ansatz methodisch *in-vitro* untersucht werden.

Die Erzeugung einer Cisplatin-resistenten Zelllinie sollte zudem verfolgt werden, da durch diese genauere Mechanismen und Auswirkungen der Hyperthermie aber auch des Zytostatikums, untersucht werden können. Die Wirkung von Hyperthermie und Cisplatin auf die Behandlung von resistenten Tumoren (Hildebrandt 2002; Beketić-Oresković et al. 1997) und somit die Erschließung neuer Therapieoptionen für viele Patienten sollte dabei im Fokus für die Verwendung im klinischen Alltag stehen.

Zusätzlich ist die Methode des Mikrokerntests noch nicht gänzlich ausgeschöpft. Weitere Untersuchungen mit Abänderungen der Cisplatinkonzentration und genauerer Analyse könnten Aufschluss darüber geben, auf welche Weise Cisplatin und Hyperthermie Mikrokerne induziert.

Die erzielten Ergebnisse dieser Promotionsarbeit sollen jedoch eine kompakte Grundlage für weitere Forschungsarbeiten im Bereich der Kombinationstherapie von Hyperthermie mit Zytostatika darstellen.

6 Zusammenfassung

Die Peritonealkarzinose ist eine maligne Tumorerkrankung, welche erst in den letzten Jahrzehnten durch den Einsatz neuer Operationstechniken und der Erfindung der hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC) besser therapiert werden kann. Dabei werden Patienten mit Metastasen im Abdominalraum oder Tumoren im Peritoneum während der Operation des Tumors mit einer lokalen Chemotherapie behandelt. Diese besteht aus einem Zytostatikum, welches erhitzt wird (41-43 °C) und mit dem während der Operation das Abdomen ausgespült wird. Bis heute ist der *in-vivo*-Mechanismus dieser Therapie kaum erforscht, während der klinische Nutzen durch etliche Studien bereits bewiesen wurde.

Abgeleitet von der Idee der HIPEC-Therapie wurden im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen von Hitze in Kombination mit dem Zytostatikum Cisplatin mittels verschiedener Methoden untersucht, welche unter anderem Genotoxizität, Vitalität und Zellmorphologie nach der Behandlung analysierten. Dabei wurden neben Comet-Assay, Mikroerntest, Durchflusszytometrie noch weitere Methoden zur Vitalitätsprüfung angewandt. Hierzu wurden vor allem HT29- und CaCo-2-Zellen verwendet, welche ursprünglich von Zellen des Dickdarmkarzinoms abstammen, die sich jedoch metastasenartig im ganzen Peritoneum ausbreiten können.

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass Hyperthermie die Zellen daran hindert sich weiterhin zu teilen und es zu zunehmender Bildung von Apoptosen und Mikrokernen führte.

Die Erwartungshaltung beim Versuchsaufbau des Comet-Assays war, dass eine Kombination von Cisplatin mit Hyperthermie zu einer stärkeren Reduktion der durch H₂O₂ induzierten DNA-Schädigung führt als eine Behandlung mit Normothermie alleine. Dies wäre dann darauf zurückzuführen, dass die quervernetzende Aktivität von Cisplatin die Ausbildung eines „Cometenschweifs“ behindert und durch Hyperthermie unterstützt würde.

In den durchgeführten Versuchen ließ sich darstellen, dass sowohl die HT29-Zellen, als auch CaCo-2-Zellen sehr gut auf die Cisplatinexposition ansprachen. Es zeigte sich, dass durch die Bildung von DNA-Addukten durch Cisplatin unter den gewählten Bedingungen keine messbare eigene DNA-Schädigung hervorgerufen wurden, jedoch ein Rückgang des durch H₂O₂ induzierten DNA-Schadens durch die Cisplatinbehandlung induziert wurde.

Die parallel durchgeführten Vitalitätstests bewiesen durch die stets hohen Vitalitätparameter, dass die im Comet Assay gemessenen Ergebnisse überwiegend auf die direkten Substanzwirkungen an der DNA zurückzuführen waren und nicht etwa auf indirekte Toxizitätsbedingte DNA-degradierende Effekte.

Die Ergebnisse bei den HT29-Zellen zeigten zudem eine signifikant größere Abnahme des DNA-Schweifs durch Cisplatinzugabe bei 42 °C im Vergleich zu 37 °C, als auch den 40 °C-Versuchen, im Vergleich zu der Positivkontrolle mit alleiniger Behandlung mit H₂O₂. Dies könnte auf eine intensivierte Adduktbildung bei 42 °C zurückzuführen sein.

Bei CaCo-2 Zellen waren vergleichbare Trends zu beobachten, allerdings waren die temperaturbedingten Unterschiede hier nicht signifikant voneinander verschieden.

Die durchgeführten Ergebnisse konnten somit die Erwartungen des Versuchsaufbaus bestätigen und zeigten, dass die quervernetzende Aktivität von Cisplatin durch Hitze unterstützt wird.

Die Durchflusszytometrie wurde zur Apoptosemessung und Nachweis von oxidativem Stress verwendet. Das Absterben bzw. die Apoptose der malignen Tumorzellen als Ziel der HIPEC-Therapie sollte mittels Annexin-Anfärbung quantifiziert werden. Die erzielten Ergebnisse waren sehr widersprüchlich, da abgelöste Zellen der 42 °C Probe in der Messung als fast ausschließlich vital gewertet wurden.

Vermehrter oxidativer Stress kann ebenfalls zum Zelltod führen. Ob Cisplatin und Hyperthermie, bzw. deren Kombination dazu führt, sollte mittels eines Versuchsaufbaus mit Verwendung von GSH und DCF untersucht werden. Bei beiden Methoden zeigten vor allem die Proben der Hyperthermiebehandlung mit 42 °C eine Erhöhung des oxidativen Stresses. Die gleichzeitige Verwendung von Hyperthermie und Cisplatin konnte keinen zusätzlichen Effekt der Kombination aufzeigen.

Der durchgeführte Vitalitätstest mit Fluoresceindiacetat (FDA) und Gel Red zeigte ähnlich widersprüchliche Ergebnisse wie die Apoptosemessung mittels Durchflusszytometrie. Auch bei dieser Methode waren die Proben, egal bei welcher Behandlung, ähnlich vital und vor allem die abgelösten Zellen der 42 °C- Probe schienen durch die Behandlung unbeeinflusst und zeigten die höchste Vitalität auf.

Die mikroskopische Betrachtung und Auswertung der Zellen ergab folgendes: Die in fast allen Methoden als vital gezählten und ausgewerteten Zellen der 42 °C-Proben waren unter dem Mikroskop als Zellen mit kondensierteren Zellkernen zu bewerten, welche in oder durch die Mitose auf dem Weg zu einem Zelltod sein könnten. Der Zellkern war in viele kleine Chromosomstücke zerbrochen und im ganzen Zytoplasma verteilt. Die mit Cisplatin bei 37 °C und 42 °C behandelten Zellen zeigten hingegen einen sehr kompakten teilweise unregelmäßigen Zellkern mit Schattierungen. Auffällig war hier, dass keine Mitosen in den Proben vorzufinden waren.

Aus den ausgewerteten Bildern und den zuvor erzielten Ergebnissen ergab sich folgende Hypothese: Hyperthermie induziert in den Tumorzellen einen Arrest in der Mitose. Die dargestellten Chromosomen sind jedoch nicht in einer Metaphasenplatte arrangiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass möglicherweise die Ursache der Arretierung die Hitzeeinwirkung auf die Spindelstruktur darstellt und diese dadurch zerstört wird. Aufgrund der morphologischen Analyse scheinen sich diese Zellen, die sich aus dem Arrest nicht befreien können, in einem möglichen Vorstadium zur Apoptose zu befinden. Diese wird häufig als sogenannte „mitotic catastrophe“ bezeichnet, wobei sich stark kondensierte Chromosomen ohne detektierbare Anordnung erkennen lassen.

Die Zellen befinden sich also durch die Hitze vermehrt in der Mitose des Zellzyklus, die im weiteren Verlauf zu einem Zelluntergang führt. Die mit Cisplatin behandelten Zellen scheinen aber überhaupt nicht mehr in der Lage zu sein, die Mitosephase zu erreichen, da keine Mitosen vorhanden sind. Sie scheinen in der G1 oder G2 Phase des Zellzyklus arretiert zu sein. Ob die Cisplatin-behandelten, im Zellzyklus arretierten Zellen, später (also nach den im Versuch gewählten Zeitraum von 24 Stunden) noch in die Apoptose gehen würden, ist aufgrund der hier erhobenen Daten weder auszuschließen noch zu bestätigen. Ob die Kombination von Cisplatin und Hyperthermie vermehrt zu Bildung von Apoptosen führt, bleibt ebenfalls ein zu klärender Fall für weitere Forschungsvorhaben. Dies müsste jedoch mit anderen Methoden als den hier eingesetzten weiter geklärt werden.

Das genaue Zusammenwirken und die Auswirkungen der Beeinflussung von Zellzyklusstadien, Gentoxizität, Zellaufbau und Proliferation bleibt zukünftig Gegenstand weiterer Untersuchungen und konnte nicht abschließend durch diese Arbeit geklärt werden. Die dargestellte Hypothese eines Zelluntergangs durch mitotic catastrophe kann jedoch ein wegweisendes Zwischenziel zur weiteren Erforschung des Zusammenwirkens von Hyperthermie und Zytostatika darstellen.

7 Literaturverzeichnis

- Alborzinia, H.; Can, S. et al. (2011): Real-time monitoring of cisplatin-induced cell death. In: *PloS one* 6 (5), S. e19714.
- Alderden, R.; Hall, M. et al. (2006): The Discovery and Development of Cisplatin. In: *J. Chem. Educ.* 83 (5), S. 728.
- Apostolou, P.; Toloudi, M. et al. (2014): Use of the comet assay technique for quick and reliable prediction of in vitro response to chemotherapeutics in breast and colon cancer. In: *Journal of biological research (Thessalonikē, Greece)* 21 (1), S. 14.
- Arany, I.; Megyesi, J. et al. (2004): Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 287 (3), S. F543-9.
- Armour, E.; McEachern, D. et al. (1993): Sensitivity of human cells to mild hyperthermia. In: *Cancer research* 53 (12), S. 2740–2744.
- Asanami, S.; Shimono, K. (1997): High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 390 (1-2), S. 79–83.
- Baek, N.; Seo, O. et al. (2016): Real-time monitoring of cisplatin cytotoxicity on three-dimensional spheroid tumor cells. In: *Drug design, development and therapy* 10, S. 2155–2165.
- Barreiro-Alonso, A.; Lamas-Maceiras, M. et al. (2016): High Mobility Group B Proteins, Their Partners, and Other Redox Sensors in Ovarian and Prostate Cancer. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, S. 5845061.
- Barry, M.; Behnke, C. et al. (1990): Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. In: *Biochemical Pharmacology* 40 (10), S. 2353–2362.
- Beere, H. (2001): Stress management – heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. In: *Trends in Cell Biology* 11 (1), S. 6–10.
- Beketić-Oresković, L.; Jaksić, M. et al. (1997): Hyperthermic modulation of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in human larynx carcinoma cells. In: *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 13 (2), S. 205–214.
- Boersma, A.; Nooter, K. et al. (1996): Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin. In: *Cytometry* 24 (2), S. 123–130.
- Boller, K.; Schmid, W. (1970): Chemische Mutagenese beim Säuger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als in vivo-Testsystem. Hämatologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. In: *Humangenetik* 11 (1), S. 35–54.

- Brücher, B.; Piso, P. et al. (2012): Peritoneal carcinomatosis: cytoreductive surgery and HIPEC--overview and basics. In: *Cancer Invest.* 30 (3), S. 209–224.
- Buttke, T.; Sandstrom, P. (1994): Oxidative stress as a mediator of apoptosis. In: *Immunology Today* 15 (1), S. 7–10.
- Caneparo, A.; Massucco, P. et al. (2014): Contamination risk for operators performing semi-closed HIPEC procedure using cisplatin. In: *Eur J Surg Oncol* 40 (8), S. 925–929.
- Cashin, P.; Ehrsson, H. et al. (2013): Pharmacokinetics of cisplatin during hyperthermic intraperitoneal treatment of peritoneal carcinomatosis. In: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 69 (3), S. 533–540.
- Cavaliere, F.; Di Filippo, F. et al. (2000): Peritonectomy and hyperthermic antitubercular perfusion in the treatment of peritoneal carcinomatosis. In: *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 26 (5), S. 486–491.
- Cavaliere, R.; Ciocatto, E. et al. (1967): Selective heat sensitivity of cancer cells. Biochemical and clinical studies. In: *Cancer* 20 (9), S. 1351–1381.
- Ceelen, W.; Bracke, M. (2009): Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. In: *The Lancet Oncology* 10 (1), S. 72–79.
- Ceelen, W.; Flessner, M. (2010): Intraperitoneal therapy for peritoneal tumors: biophysics and clinical evidence. In: *Nat Rev Clin Oncol* 7 (2), S. 108–115.
- Ceelen, W.; Hesse, U. et al. (2000): Hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion in the treatment of locally advanced intra-abdominal cancer. In: *Br J Surg* 87 (8), S. 1006–1015.
- Chang-Liu, C.-M.; Woloschak, G. (1997): Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. In: *Cancer Letters* 113 (1-2), S. 77–86.
- Chen, F.; Wang, C.-C. et al. (2008): Hyperthermia in combination with oxidative stress induces autophagic cell death in HT-29 colon cancer cells. In: *Cell biology international* 32 (7), S. 715–723.
- Chu, D.; Lang, N. et al. (1989): Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors. In: *Cancer* 63 (2), S. 364–367.
- Chua, T.; Yan, T. et al. (2009): Should the treatment of peritoneal carcinomatosis by cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy still be regarded as a highly morbid procedure?: a systematic review of morbidity and mortality. In: *Ann. Surg.* 249 (6), S. 900–907.
- Ciarimboli, G. (2014): Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. In: *Anticancer Res.* 34 (1), S. 547–550.
- Connors, T.; Roberts, J. (1974): *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Recent Results in Cancer Research, 48).

- Coss, R.; Dewey, W. et al. (1982): Effects of hyperthermia on dividing Chinese hamster ovary cells and on microtubules in vitro. In: *Cancer research* 42 (3), S. 1059–1071.
- Cunliffe, W.; Sugarbaker, P. (1989): Gastrointestinal malignancy: rationale for adjuvant therapy using early postoperative intraperitoneal chemotherapy. In: *Br J Surg* 76 (10), S. 1082–1090.
- Davidson, J.; Whyte, B. et al. (1996): Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (10), S. 5116–5121.
- Dedrick, R.; Myers, C. et al. (1978): Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer. In: *Cancer Treat Rep* 62 (1), S. 1–11.
- Drew, R.; Miners, J. (1984): The effects of buthionine sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. In: *Biochemical Pharmacology* 33 (19), S. 2989–2994.
- Dube, P.; Sideris, L. et al. (2015): Guidelines on the use of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal surface malignancy arising from colorectal or appendiceal neoplasms. In: *Current oncology (Toronto, Ont.)* 22 (2), S. e100-12.
- Duffaud, F.; Orsière, T. et al. (1998): Génotoxicité de la doxorubicine et du cisplatine: recherche d'un témoin positif pour le test des micronoyaux. In: *Annales de biologie clinique* 56 (2), S. 183–187.
- Elias, D.; Glehen, O. et al. (2010): A comparative study of complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemotherapy to treat peritoneal dissemination from colon, rectum, small bowel, and nonpseudomyxoma appendix. In: *Ann. Surg.* 251 (5), S. 896–901.
- Elias, D.; Lefevre, J. et al. (2009): Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. In: *J. Clin. Oncol.* 27 (5), S. 681–685.
- Elmore, S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicologic pathology* 35 (4), S. 495–516.
- Erenpreisa, J.; Ivanov, A. et al. (2000): Arrest in metaphase and anatomy of mitotic catastrophe: mild heat shock in two human osteosarcoma cell lines. In: *Cell biology international* 24 (2), S. 61–70.
- Esquivel, J. (2009): Technology of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the United States, Europe, China, Japan, and Korea. In: *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 15 (3), S. 249–254.
- Fabbri, F.; Amadori, D. et al. (2008): Mitotic catastrophe and apoptosis induced by docetaxel in hormone-refractory prostate cancer cells. In: *Journal of cellular physiology* 217 (2), S. 494–501.
- Fairbairn, D.; Olive, P. et al. (1995a): The comet assay: a comprehensive review. In: *Mutation research* 339 (1), S. 37–59.

- Fairbairn, D.; Olive, P. et al. (1995b): The comet assay: a comprehensive review. In: *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 339 (1), S. 37–59.
- Fenech, M. (2006): Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. In: *Mutation research* 600 (1-2), S. 58–66.
- Fenech, M.; Morley, A. (1985): Measurement of micronuclei in lymphocytes. In: *Mutation research* 147 (1-2), S. 29–36.
- Florea, A.-M.; Büsselberg, D. (2011): Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. In: *Cancers* 3 (1), S. 1351–1371.
- Folprecht, G.; Köhne, C. et al. (2007): Systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. In: *Cancer Treat. Res.* 134, S. 425–440.
- Fuertes, M.; Alonso, C. et al. (2003): Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. In: *Chem. Rev.* 103 (3), S. 645–662.
- Galluzzi, L.; Senovilla, L. et al. (2012): Molecular mechanisms of cisplatin resistance. In: *Oncogene* 31 (15), S. 1869–1883.
- Gao, Y.-G.; Sriram, M. et al. (1993): Crystallographic studies of metal ion - DNA interactions: different binding modes of cobalt(II), copper(II) and barium(II) to N 7 of guanines in Z-DNA and a drug-DNA complex. In: *Nucl Acids Res* 21 (17), S. 4093–4101.
- Gately, D.; Howell, S. (1993): Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. In: *Br. J. Cancer* 67 (6), S. 1171–1176.
- Gatto, G.; Ao, Z. et al. (2013): NADPH oxidase-dependent and -independent mechanisms of reported inhibitors of reactive oxygen generation. In: *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 28 (1), S. 95–104.
- Gebel, T.; Lantzsch, H. et al. (1997): Genotoxicity of platinum and palladium compounds in human and bacterial cells. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 389 (2-3), S. 183–190.
- Glehen, O.; Cotte, E. et al. (2008): Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: nomenclature and modalities of perfusion. In: *Journal of surgical oncology* 98 (4), S. 242–246.
- Glehen, O.; Kwiatkowski, F. et al. (2004): Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a multi-institutional study. In: *J. Clin. Oncol.* 22 (16), S. 3284–3292.
- González-Moreno, S. (2007): *Advances in peritoneal surface oncology*. Berlin, New York: Springer (Resent results in cancer research, 169).
- González-Moreno, S.; González-Bayón, L. et al. (2010): Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: Rationale and technique. In: *World J Gastrointest Oncol* 2 (2), S. 68–75.

Gosslau, A.; Jao, D. et al. (2009): Thermal killing of human colon cancer cells is associated with the loss of eukaryotic initiation factor 5A. In: *Journal of cellular physiology* 219 (2), S. 485–493.

Griffith, O.; Meister, A. (1979): Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (11), S. 5606–5610.

Hahn, G. (1979): Potential for therapy of drugs and hyperthermia. In: *Cancer Res.* 39 (6 Pt 2), S. 2264–2268.

Hahn, G. (1982): *Hyperthermia and Cancer*. Boston, MA: Springer US.

Halamikova, A.; Vrana, O. et al. (2007): Biochemical studies of the thermal effects on DNA modifications by the antitumor cisplatin and their repair. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 8 (16), S. 2008–2015.

Harmon, R.; Sugarbaker, P. (2005): Prognostic indicators in peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer. In: *Int Semin Surg Oncol* 2 (1), S. 3.

Hasan, N.; Adams, G. et al. (1998): Hypoxia facilitates tumour cell detachment by reducing expression of surface adhesion molecules and adhesion to extracellular matrices without loss of cell viability. In: *British journal of cancer* 77 (11), S. 1799–1805.

Hasovits, C.; Clarke, S. (2012): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intraperitoneal cancer chemotherapeutics. In: *Clin Pharmacokinet* 51 (4), S. 203–224.

Hettinga, J.; Lemstra, W. et al. (1996): Heat-shock protein expression in cisplatin-sensitive and -resistant human tumor cells. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 67 (6), S. 800–807.

Hildebrandt, B. (2002): The cellular and molecular basis of hyperthermia. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 43 (1), S. 33–56.

Hintzsche, H.; Polat, B. et al. (2012a): Micronucleus formation kinetics in buccal mucosa cells of head and neck cancer patients undergoing radiotherapy. In: *Toxicology letters* 212 (1), S. 33–37.

Hintzsche, H.; Riese, T. et al. (2012b): Hyperthermia-induced micronucleus formation in a human keratinocyte cell line. In: *Mutation research* 738-739, S. 71–74.

Holzer, A.; Howell, S. (2006): The internalization and degradation of human copper transporter 1 following cisplatin exposure. In: *Cancer Res.* 66 (22), S. 10944–10952.

Howle, J.; Gale, G. (1970): CIS-dichlorodiammineplatinum (II). In: *Biochemical Pharmacology* 19 (10), S. 2757–2762.

Husain, I.; Chaney, S. et al. (1985): Repair of cis-platinum-DNA adducts by ABC excinuclease in vivo and in vitro. In: *J. Bacteriol.* 163 (3), S. 817–823.

- Ianzini, F.; Mackey, M. (1998): Delayed DNA damage associated with mitotic catastrophe following X-irradiation of HeLa S3 cells *. In: *Mutagenesis* 13 (4), S. 337–344.
- Imlay, J.; Chin, S. et al. (1988): Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. In: *Science* 240 (4852), S. 640–642.
- Ishida, S.; Lee, J. et al. (2002): Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (22), S. 14298–14302.
- Ishikawa, T.; Wright, C. et al. (1994): GS-X pump is functionally overexpressed in cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human leukemia HL-60 cells and down-regulated by cell differentiation. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (46), S. 29085–29093.
- Jayne, D.; Fook, S. et al. (2002): Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. In: *Br J Surg* 89 (12), S. 1545–1550.
- Kauffman, G.; Pentimalli, R. et al. (2010): Michele Peyrone (1813-1883), Discoverer of Cisplatin. In: *Platinum Metals Review* 54 (4), S. 250–256.
- Kepekian, V.; Aloy, M.-T. et al. (2013): Impact of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy on Hsp27 protein expression in serum of patients with peritoneal carcinomatosis. In: *Cell stress & chaperones* 18 (5), S. 623–630.
- Keston, A.; Brandt, R. (1965): The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. In: *Analytical Biochemistry* 11 (1), S. 1–5.
- Kimura, M.; Yoshioka, T. et al. (2013): Mitotic catastrophe and cell death induced by depletion of centrosomal proteins. In: *Cell death & disease* 4, S. e603.
- Kliesch, U.; Adler, I.-D. (1987): Micronucleus test in bone marrow of mice treated with 1-nitropropane, 2-nitropropane and cisplatin. In: *Mutation Research Letters* 192 (3), S. 181–184.
- Kokura, S.; Yoshikawa, T.; Ohnishi, T. (2016): Hyperthermic oncology from bench to bedside. Singapore: Springer.
- Krastev, N.; Djurkov, V. et al. (2013): Intraperitoneal perfusion chemotherapy with hyperthermia in some malignant ascites. In: *Khirurgiia (Sofia)* (4), S. 11–18.
- Kuijpers, A.; Mirck, B. et al. (2013): Cytoreduction and HIPEC in the Netherlands: nationwide long-term outcome following the Dutch protocol. In: *Ann. Surg. Oncol.* 20 (13), S. 4224–4230.
- Kusamura, S.; O'Dwyer, S. et al. (2008): Technical aspects of cytoreductive surgery. In: *J Surg Oncol* 98 (4), S. 232–236.
- Landon, C.; Benjamin, S. et al. (2013): A role for the copper transporter Ctr1 in the synergistic interaction between hyperthermia and cisplatin treatment. In: *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for*

Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group 29 (6), S. 528–538.

Larkin, J.; Edwards, W. et al. (1977): Systemic thermotherapy: description of a method and physiologic tolerance in clinical subjects. In: *Cancer* 40 (6), S. 3155–3159.

Lengauer, C.; Kinzler, K. et al. (1997): Genetic instability in colorectal cancers. In: *Nature* 386 (6625), S. 623–627.

Liévin-Le Moal, V.; Servin, A. (2013): Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 77 (3), S. 380–439.

Mackey, M.; Morgan, W. et al. (1988): Nuclear fragmentation and premature chromosome condensation induced by heat shock in S-phase Chinese hamster ovary cells. In: *Cancer research* 48 (22), S. 6478–6483.

Martins, E.; Chubatsu, L. et al. (1991): Role of antioxidants in protecting cellular DNA from damage by oxidative stress. In: *Mutation research* 250 (1-2), S. 95–101.

Martins, N.; Santos, N A G et al. (2008): Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. In: *Journal of applied toxicology : JAT* 28 (3), S. 337–344.

Marullo, R.; Werner, E. et al. (2013): Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. In: *PloS one* 8 (11), S. e81162.

Masuda, H.; Tanaka, T. et al. (1994): Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. In: *Biochemical and biophysical research communications* 203 (2), S. 1175–1180.

McA'Nulty, M.; Lippard, S. (1996): The HMG-domain protein Ixr1 blocks excision repair of cisplatin-DNA adducts in yeast. In: *Mutation Research/DNA Repair* 362 (1), S. 75–86.

McQuellon, R.; Loggie, B. et al. (2001): Quality of life after intraperitoneal hyperthermic chemotherapy (IPHC) for peritoneal carcinomatosis. In: *Eur J Surg Oncol* 27 (1), S. 65–73.

Molz, L.; Booher, R. et al. (1989): cdc2 and the regulation of mitosis: six interacting mcs genes. In: *Genetics* 122 (4), S. 773–782.

Mondovì, B.; Rotilio, G. et al. (1968): Biochemical mechanism of selective heat sensitivity of tumour cells: preliminary results. In: *Ital. J. Biochem.* 17 (2), S. 101–106.

Moradi, B.; Esquivel, J. (2009): Learning curve in cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. In: *J Surg Oncol* 100 (4), S. 293–296.

Mueller, S.; Schittenhelm, M. et al. (2006): Cell-cycle progression and response of germ cell tumors to cisplatin in vitro. In: *International journal of oncology* 29 (2), S. 471–479.

Munchausen, L. (1974): The chemical and biological effects of cis-dichlorodiammineplatinum (II), an antitumor agent, on DNA. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71 (11), S. 4519–4522.

Mussa, A. (2010): New technologies in surgical oncology. Dordrecht: Springer (Updates in surgery).

Nakahata, K.; Miyakoda, M. et al. (2002): Heat shock induces centrosomal dysfunction, and causes non-apoptotic mitotic catastrophe in human tumour cells. In: *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 18 (4), S. 332–343.

Ngan, C.; Yamamoto, H. et al. (2008): Oxaliplatin induces mitotic catastrophe and apoptosis in esophageal cancer cells. In: *Cancer science* 99 (1), S. 129–139.

OECD (2010): Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test: OECD Publishing.

Olive, P.; Banath, J. (2009): Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. In: *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 76 (2), S. 79–90.

Olive, P.; Banath, J. (2006): The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. In: *Nat Protoc* 1 (1), S. 23–29.

Ostling, O.; Johanson, K. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123 (1), S. 291–298.

Overgaard, J. (1977): Effect of hyperthermia on malignant cells in vivo: A review and a hypothesis. In: *Cancer* 39 (6), S. 2637–2646.

Ozben, T. (2007): Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 96 (9), S. 2181–2196.

Pavlik, E.; Flanigan, R. et al. (1985): Esterase Activity, Exclusion of Propidium Iodide, and Proliferation in Tumor Cells Exposed to Anticancer Agents: Phenomena Relevant to Chemosensitivity Determinations. In: *Cancer Invest* 3 (5), S. 413–426.

Payet, D.; Gaucheron, F. et al. (1993): Instability of the monofunctional adducts in cis-[Pt(NH₃)₂(N⁷-N-methyl-2-diazapyrenium)Cl]⁽²⁺⁾-modified DNA: rates of cross-linking reactions in cis-platinum-modified DNA. In: *Nucleic Acids Res.* 21 (25), S. 5846–5851.

Pelz, Joerg O W; Vetterlein, M. et al. (2013): Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis: role of heat shock proteins and dissecting effects of hyperthermia. In: *Annals of surgical oncology* 20 (4), S. 1105–1113.

Peyrone, M. (1844): Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. In: *Ann. Chem. Pharm.* 51 (1), S. 1–29.

Piso, P.; Arnold, D. (2011): Multimodal treatment approaches for peritoneal carcinosis in colorectal cancer. In: *Dtsch Arztebl Int* 108 (47), S. 802–808.

Qu, K.; Lin, T. et al. (2013): Cisplatin induces cell cycle arrest and senescence via upregulating P53 and P21 expression in HepG2 cells. In: *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 33 (9), S. 1253–1259.

Raber, J.; Zhu, C. et al. (2005): Theoretical study of cisplatin binding to DNA: the importance of initial complex stabilization. In: *J Phys Chem B* 109 (21), S. 11006–11015.

Rampone, B.; Schiavone, B. et al. (2010): Current role of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the treatment of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. In: *World J. Gastroenterol.* 16 (11), S. 1299–1302.

Reedijk, J.; Lohman, P. (1985): Cisplatin: synthesis, antitumour activity and mechanism of action. In: *Pharmaceutisch weekblad. Scientific edition* 7 (5), S. 173–180.

Reuter, S.; Gupta, S. et al. (2010): Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? In: *Free radical biology & medicine* 49 (11), S. 1603–1616.

Rice, G.; Bump, E. et al. (1986): Quantitative analysis of cellular glutathione by flow cytometry utilizing monochlorobimane: some applications to radiation and drug resistance in vitro and in vivo. In: *Cancer research* 46 (12 Pt 1), S. 6105–6110.

Richon, V.; Schulte, N. et al. (1987): Multiple mechanisms of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in murine leukemia L1210 cells. In: *Cancer Res.* 47 (8), S. 2056–2061.

Roberts, J.; PERA, M. (1983): DNA as a Target for Anticancer Coordination Compounds. In: Stephen J. Lippard (Hg.): *Platinum, Gold, and Other Metal Chemotherapeutic Agents*, Bd. 209. WASHINGTON, D.C.: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS Symposium Series), S. 3–25.

Rofstad, E.; Falkvoll, K. et al. (1984): Micronucleus formation in human melanoma xenografts following exposure to hyperthermia. In: *Radiation and environmental biophysics* 23 (1), S. 51–60.

Rosenberg, B. (1971): Some Biological Effects of Platinum Compounds. NEW AGENTS FOR THE CONTROL OF TUMOURS. In: *Platinum Metals Review* 15, S. 42–52.

Rosenberg, B.; van Camp, L. et al. (1967): The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum(IV) complexes. In: *J. Biol. Chem.* 242 (6), S. 1347–1352.

Rosenberg, B.; VanCamp, L. et al. (1965): Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. In: *Nature* 205, S. 698–699.

Rosenberg, B.; VanCamp, L. et al. (1969): Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. In: *Nature* 222 (5191), S. 385–386.

Rossi Fanelli, A.; Cavaliere, R.; Mondovì, B.; Moricca, G. (1977): Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Recent Results in Cancer Research / Fortschritte der Krebsforschung / Progrès dans les recherches sur le cancer, 59).

Sadeghi, B.; Arvieux, C. et al. (2000): Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. In: *Cancer* 88 (2), S. 358–363.

Sampson, J. (1931): Implantation Peritoneal Carcinomatosis of Ovarian Origin. In: *Am. J. Pathol.* 7 (5), S. 423-444.39.

Schrek, R. (1936): A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. In: *The American Journal of Cancer* (28.2), S. 389–392.

Schubert, R.; Erker, L. et al. (2004): Cancer chemoprevention by the antioxidant tempol in Atm-deficient mice. In: *Human molecular genetics* 13 (16), S. 1793–1802.

Seretis, C.; Youssef, H. (2014): Quality of life after cytoreductive surgery and intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for peritoneal surface malignancies: A systematic review. In: *Eur J Surg Oncol.*

Shapiro, G.; Harper, J. (1999): Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. In: *The Journal of clinical investigation* 104 (12), S. 1645–1653.

Shchepotin, I.; Soldatenkov, V. et al. (1997): Apoptosis induced by hyperthermia and verapamil in vitro in a human colon cancer cell line. In: *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 13 (5), S. 547–557.

Sherman, M.; Multhoff, G. (2007): Heat shock proteins in cancer. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1113, S. 192–201.

Shi, L.; Nishioka, W. et al. (1994): Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. In: *Science (New York, N.Y.)* 263 (5150), S. 1143–1145.

Shooter, K.; Howse, R. et al. (1972): The interaction of platinum II compounds with bacteriophages T7 and R17. In: *Chemico-Biological Interactions* 5 (5), S. 289–307.

Siddik, Z. (2003): Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. In: *Oncogene* 22 (47), S. 7265–7279.

Siewert, G. (2010): Praxis der Viszeralchirurgie. 3. Aufl., Heidelberg: Springer Medizin.

Singh, N.; McCoy, M. et al. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. In: *Exp. Cell Res.* 175 (1), S. 184–191.

Skibba, J.; Powers, R. et al. (1991): Oxidative stress as a precursor to the irreversible hepatocellular injury caused by hyperthermia. In: *International*

journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group 7 (5), S. 749–761.

Speeten, K.; Stuart, O. et al. (2009): Using Pharmacologic Data to Plan Clinical Treatments for Patients with Peritoneal Surface Malignancy. In: *CDDT* 6 (1), S. 72–81.

Spratt, J.; Adcock, R. et al. (1980): Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. In: *Cancer Res.* 40 (2), S. 256–260.

Stopper, H.; Müller, S. (1997): Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 11 (5), S. 661–667.

Streffer, C. (1985): Review: Metabolic changes during and after hyperthermia. In: *Int J Hyperthermia* 1 (4), S. 305–319.

Sugarbaker, P. (1988): Surgical management of peritoneal carcinosis: diagnosis, prevention and treatment. In: *Langenbecks Arch Chir* 373 (3), S. 189–196.

Sugarbaker, P. (1989): Management of peritoneal carcinomatosis. In: *Acta Med. Austriaca* 16 (3-4), S. 57–60.

Sugarbaker, P. (1995): Peritonectomy procedures. In: *Ann. Surg.* 221 (1), S. 29–42.

Sugarbaker, P. (1996): Observations concerning cancer spread within the peritoneal cavity and concepts supporting an ordered pathophysiology. In: *Cancer Treat. Res.* 82, S. 79–100.

Sugarbaker, P. (2014): Update on the prevention of local recurrence and peritoneal metastases in patients with colorectal cancer. In: *World J. Gastroenterol.* 20 (28), S. 9286–9291.

Sugarbaker, P.; Cunliffe, W. et al. (1989): Rationale for integrating early postoperative intraperitoneal chemotherapy into the surgical treatment of gastrointestinal cancer. In: *Semin. Oncol.* 16 (4 Suppl 6), S. 83–97.

Sugarbaker, P.; Jablonski, K. (1995): Prognostic features of 51 colorectal and 130 appendiceal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy. In: *Ann. Surg.* 221 (2), S. 124–132.

Sugarbaker, P.; Mora, J. et al. (2005): Update on chemotherapeutic agents utilized for perioperative intraperitoneal chemotherapy. In: *Oncologist* 10 (2), S. 112–122.

Swift, L.; Golsteyn, R. (2016): Cytotoxic amounts of cisplatin induce either checkpoint adaptation or apoptosis in a concentration-dependent manner in cancer cells. In: *Biology of the cell* 108 (5), S. 127–148.

Tait, J.; Gibson, D. et al. (1989): Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (14), S. 7944–7949.

- Takayama, S.; Reed, J. et al. (2003): Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. In: *Oncogene* 22 (56), S. 9041–9047.
- Tentes, A.-A.; Tripsiannis, G. et al. (2003): Peritoneal cancer index: a prognostic indicator of survival in advanced ovarian cancer. In: *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 29 (1), S. 69–73.
- Tice, R.; Agurell, E. et al. (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. In: *Environmental and molecular mutagenesis* 35 (3), S. 206–221.
- Timonem, S.; Therman E. (1950): The changes in the mitotic mechanism of human cancer cells. In: *Cancer research* 10 (7), S. 431–439.
- Tromans, D. (1998): Temperature and pressure dependent solubility of oxygen in water: a thermodynamic analysis. In: *Hydrometallurgy* 48 (3), S. 327–342.
- Turaga, K.; Levine, E. et al. (2014): Consensus guidelines from The American Society of Peritoneal Surface Malignancies on standardizing the delivery of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in colorectal cancer patients in the United States. In: *Ann. Surg. Oncol.* 21 (5), S. 1501–1505.
- Vakifahmetoglu, H.; Olsson, M. et al. (2008): DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. In: *Cell death and differentiation* 15 (3), S. 555–566.
- van Engeland, M.; Nieland, L. et al. (1998): Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. In: *Cytometry* 31 (1), S. 1–9.
- van Engeland, M.; Ramaekers, F. et al. (1996): A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. In: *Cytometry* 24 (2), S. 131–139.
- Vermes, I.; Haanen, C. et al. (1995): A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. In: *Journal of Immunological Methods* 184 (1), S. 39–51.
- Vermes, I.; Haanen, C. et al. (2000): Flow cytometry of apoptotic cell death. In: *Journal of Immunological Methods* 243 (1-2), S. 167–190.
- Vermeulen, K.; Van Bockstaele, Dirk R. et al. (2003): The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. In: *Cell Prolif* 36 (3), S. 131–149.
- Verwaal, V.; van Ruth, S. et al. (2003): Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. In: *J. Clin. Oncol.* 21 (20), S. 3737–3743.
- Vitale, I.; Galluzzi, L. et al. (2011): Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (6), S. 385–392.

- Wallner, K.; DeGregorio, M. et al. (1986): Hyperthermic potentiation of cis-diamminedichloroplatinum(II) cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells resistant to the drug. In: *Cancer research* 46 (12 Pt 1), S. 6242–6245.
- Wang, C.-C.; Chen, F. et al. (2007): Thermal sensitization through ROS modulation: a strategy to improve the efficacy of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. In: *Surgery* 142 (3), S. 384–392.
- Wang, H.; Joseph, J. (1999): Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. ¹Mention of a trade name, proprietary product, or specific equipment does not constitute a guarantee by the United States Department of Agriculture and does not imply its approval to the exclusion of other products that may be suitable. In: *Free Radical Biology and Medicine* 27 (5-6), S. 612–616.
- Weiss, R.; Poster, D. (1982): The renal toxicity of cancer chemotherapeutic agents. In: *Cancer Treatment Reviews* 9 (1), S. 37–56.
- Werner, A. (1893): Beitrag zur Konstitution anorganischer Verbindungen. In: *Z. Anorg. Chem. (Zeitschrift für anorganische Chemie)* 3 (1), S. 267–330.
- Wiltshaw, E. (1979): Cisplatin in the Treatment of Cancer. The first metal anti-tumour drug. In: *Platinum Metals Review* (23), S. 90–98.
- Yan, T.; Black, D. et al. (2006): Systematic review on the efficacy of cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis from colorectal carcinoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (24), S. 4011–4019.
- Yang, C.; Kaushal, V. et al. (2008): Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 294 (4), S. F777-87.
- Yang, D.; Wang, A. (1996): Structural studies of interactions between anticancer platinum drugs and DNA. In: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 66 (1), S. 81–111.
- Yang, X. (1999): Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. In: *Pharmacology & Therapeutics* 83 (3), S. 181–215.
- Zijian Guo, Peter J. Sadler (2000): Medicinal Inorganic Chemistry. San Diego: Academic Press (Advances in inorganic chemistry, v. 49).
- Zunino, B.; Rubio-Patino, C. et al. (2016): Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy leads to an anticancer immune response via exposure of cell surface heat shock protein 90. In: *Oncogene* 35 (2), S. 261–268.
- Zwaal, R.; Comfurius, P. et al. (2005): Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (9), S. 971–988.

8 Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

- Abbildung 1: Pathogenese der Peritonealkarzinose; 1 Zellablösung, 2 Zelladhäsion, 3 Apoptoseinduktion, 4 Invasion, 5 Degradation und Invasion (nach Ceelen et Bracke 2009)
Copyright vorliegend
- Abbildung 2: Stadieneinteilung der Peritonealkarzinose nach Sugarbaker (Sugarbaker et Jablonski 1995)
Copyright vorliegend
- Abbildung 3: Schematische Darstellung Mikrokernbildung: 1 Zelle mit schwarzem Zellkern in der Mitte, 2 Zelle in der Mitose, 3 geteilte Zellkerne mit kleinem schwarzem Mikrokern
- Abbildung 4: Darstellung eines Mikrokerns in der mittigen Zelle -nach Zellteilung entstandene Zelle mit 2 Zellkernen und weiterem DNA-haltigen Fragment (→) Mikrokern
- Abbildung 5: Darstellung einer Zelle im Comet-Assay
- Abbildung 6: Apoptosedetektion mittels Annexin-V-FLUOS Markierung
- Abbildung 7: Mikrokerntest – HCT116, 24 Stunden Kultivierung bei 37 °C oder bei 40 °C; n=1
- Abbildung 8: Mikrokerntest – HaCaT, 24 Stunden Kultivierung bei 37 °C oder bei 40 °C mit/ohne 5 µM VAS oder 50 µM Tempol; n=1
- Abbildung 9: Mikrokerntest – CaCo-2, 24 Stunden Kultivierung bei 37 °C oder bei 40 °C; n=1
- Abbildung 10: Mikrokerntest – HT29 Zeitintervallversuche mit 40 °C - Expositionszeiten von 2 Stunden, 8 Stunden und 24 Stunden, n=1
- Abbildung 11: Mikrokerntest – HT29 Zeitintervallversuche mit 42 °C - Expositionszeiten von 2 Stunden, 8 Stunden und 24 Stunden, n=1
- Abbildung 12: Mikrokerntest – HT29 Hitzeexposition bei 37 °C oder bei 40 °C mit 50 µM Tempol; Inkubationszeit 24 Stunden, n=3
Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = $p \leq 0,05$ vs. NK, Mann Whitney U Test
- Abbildung 13: Mikrokerntest – HT29 Passagenvergleich p11/12/12 und p51/52/52 bei 37 °C oder bei 40 °C, Inkubationszeit 24 Stunden; n=3
- Abbildung 14: Comet-Assay - HT29 Hitzeexposition bei 37 °C mit/ohne 125 µM H₂O₂ und mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3,
Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = $p \leq 0,05$ vs. NK, # = $p \leq 0,05$ - 125 µM H₂O₂ vs. Cisplatin 50 µg/ml + 125 µM H₂O₂, Mann Whitney U Test

- Abbildung 15: Comet-Assay - HT29 Hitzeexposition bei 40 °C mit/ohne 125 µM H₂O₂ und mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3, Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = p ≤ 0,05 vs. NK, Mann Whitney U Test
- Abbildung 16: Comet-Assay - HT29 Hitzeexposition bei 42 °C mit/ohne 125 µM H₂O₂ und mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3, Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = p ≤ 0,05 vs. NK, # = p ≤ 0,05 - 125 µM H₂O₂ vs. Cisplatin 50 µg/ml + 125 µM H₂O₂, Mann Whitney U Test
- Abbildung 17: Comet-Assay – CaCo-2 Hitzeexposition bei 37 °C mit/ohne 125 µM H₂O₂ und mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3, Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = p ≤ 0,05 vs. NK, Mann Whitney U Test
- Abbildung 18: Comet-Assay – CaCo2 Hitzeexposition bei 40 °C mit/ohne 125 µM H₂O₂ und mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3, Mittelwert +/- Standardabweichungen
- Abbildung 19: Comet-Assay – CaCo2 Hitzeexposition bei 42 °C mit/ohne 125 µM H₂O₂ und mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3, Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = p ≤ 0,05 vs. NK, Mann Whitney U Test
- Abbildung 20 a: Durchflusszytometrie – Apoptosedetektion – HT29-Zellpellet, Hitzeexposition 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; Mittelwert mit Standardabweichung Lower Right; n=4 Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = p ≤ 0,05 vs. NK, Mann Whitney U Test
- Abbildung 21: Durchflusszytometrie – Messung des oxidativer Stress mittels GSH-Gehalt - HT29 – Zellpellet, Hitzeexposition mit/ohne 50 µM BSO bei 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin, Mittelwert mit Standardabweichung; n=3
- Abbildung 22: Durchflusszytometrie – Messung des oxidativer Stress mittels GSH-Gehalt- HT29 – Überstand, Hitzeexposition mit/ohne 50 µM BSO bei 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin, Mittelwert mit Standardabweichung; n=3
- Abbildung 23: Durchflusszytometrie – Messung des oxidativen Stress mittels DCF Gehalts - HT29 – Zellpellet, Hitzeexposition bei 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin, Mittelwert mit Standardabweichung; n=3
- Abbildung 24: Durchflusszytometrie – Messung des oxidativen Stress mittels DCF Gehalts - HT29 –Überstand, Hitzeexposition bei 37 °C und 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin, n=2; Mittelwert +/- Standardabweichungen
- Abbildung 25: Vitalitätstest – HT29 – Zellpellet, Hitzeexposition 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=3; Mittelwert +/- Standardabweichungen
- Abbildung 26: Vitalitätstest – HT29-Überstand, Hitzeexposition bei 37 °C oder bei 42 °C mit/ohne 50 µg/ml Cisplatin; n=2; Mittelwert +/- Standardabweichungen

- Abbildung 27: Zellzahlbestimmung mit Neubauerkammer – HT29-Zellpellet; n=3; Mittelwert +/- Standardabweichungen
- Abbildung 28 a-d: Mikroskopische Aufnahmen der mit Cisplatin (50 µg/ml; b,d) und/oder Hyperthermie (42 °C; c,d) behandelten HT29-Zellpellet-Proben und morphologische Auswertung, Anfärbung mit Gel Green, Inkubationsdauer 24 Stunden; n=3; Pfeil in Bild 3c: Markierung zeigt eine Zelle mit kondensiertem Chromatin
- Abbildung 29: Zellzahlbestimmung mit Neubauerkammer – HT29-Zellen im Überstand, n=3; Mittelwert +/- Standardabweichungen, * = $p \leq 0,05$ vs. NK, # = $p \leq 0,05$ vs. NK, Mann Whitney U Test
- Abbildung 30 a-d: Mikroskopische Aufnahmen der mit Cisplatin (50 µg/ml; b, d) und/oder Hyperthermie (42 °C; c, d) behandelten HT29-Zellen im Überstand und morphologische Auswertung, Anfärbung mit Gel Green, Inkubationsdauer 24 Stunden, n=3

Tabellen

- Tabelle 1: Inzidenz einer Peritonealkarzinose bei verschiedenen Tumorentitäten nach Piso et al. (2011)
- Tabelle 2: Stadieneinteilung der Peritonealkarzinose nach Gilly et al. (1994)
- Tabelle 3: Pharmakologische Charakteristika und Daten von Zytostatika, die intraperitoneal beim kolorektalen Karzinom mit Peritonealkarzinose eingesetzt werden (modifiziert nach Piso et Arnold 2011, Ceelen et Bracke 2009)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Helga Stopper bedanken, die mir es ermöglicht hat, meine Promotion in Ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Sie stand mir stets mit Ratschlägen, neuen Ideen und aufmunternden Worten zur Seite und hat mich während der gesamten Dauer meiner Promotionsarbeit hervorragend betreut. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Henning Hintzsche für die umfassende und kompetente Betreuung meiner Promotionsarbeit. Seine stets konstruktiven Anmerkungen halfen mir dabei, die gesammelten Daten aufzubereiten, meine Arbeit wissenschaftlich zu hinterfragen und dadurch am Ende die Qualität des Ergebnisses zu verbessern. Ich möchte mich zudem für die Offenheit, Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit mit der gesamten Arbeitsgruppe Stopper bedanken. Zuletzt möchte ich meiner Familie und besonders meinen Eltern Gabriele Wolz-Curtaz und Klaus Curtaz, denen ich diese Arbeit widme, für ihre Unterstützung jeglicher Art während meines gesamten Studiums und Berufseinstiegs großen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Carolin Julia Curtaz

Persönliche Daten

Name: Carolin Julia Curtaz
Geburtsjahr: 1989
Wohnort: Estenfeld

Beruflicher Werdegang/Schul- und Hochschulausbildung

- 11/2018 **Rigorosum der Medizinischen Promotion**
Toxikologie Universität Würzburg,
AG Prof. Dr. Helga Stopper - experimentelle Doktorarbeit
Thema: In vitro Analysen der Wechselwirkung
erhöhter Temperatur mit Zytostatika am Beispiel von Cisplatin
- Seit 08/2016 **Frauenklinik und Poliklinik Universitätsklinikum Würzburg**
Assistenzärztin
- 10/2009 - 06/2016 **Julius-Maximilians-Universität Würzburg**
Studiengang: Humanmedizin
- 06/2016 **Ablegen des Dritten Abschnitts**
der Ärztlichen Prüfung
- 01/2016 - 04/2016 **PJ Terial Fachbereich Chirurgie**
Kantonspital Münsterlingen, Schweiz
- 09/2015 - 12/2015 **PJ Terial Fachbereich Innere Medizin**
Universitätsklinik Würzburg, ZIM,
Rheumatologie/Infektiologie/Hämatologie und
Kardiologie
- 05/2015 - 09/2015 **PJ Terial Fachbereich Gynäkologie**
CHRU Hautepierre Straßburg, Frankreich
- 05/2015 **Ablegen des Zweiten Abschnitts**
der Ärztlichen Prüfung
- 02/2013 - 06/2013 **einsemestriger Studienaufenthalt**
in Caen/Frankreich
- 08/2011 **Ablegen des Ersten Abschnitts**
der Ärztlichen Prüfung
- 09/2000 bis 07/2009 **Matthias-Grünewald-Gymnasium Würzburg**
Schulabschluss: Allg. Hochschulreife
- 08/2006 - 06/2007 High School Jahr: Rome/Georgia, USA

Würzburg, November 2018