



UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES

UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

- MEDIZINISCHE FAKULTÄT HOMBURG/SAAR -

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Glanemann

DISSERTATION

Elektrochemotherapie mit intravenöser Verabreichung von Bleomycin, Oxaliplatin und Oxaliplatin in Kombination mit Bevacizumab zur Behandlung von hepatischen Metastasen des kolorektalen Karzinoms im Rattenmodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2026

vorgelegt von:

Orestis Mallis Kyriakides

geb. am: 16.05.1996 in Nikosia, Zypern

Tag der Promotion: 05.05.2026

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Glanemann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jörn Markus Schattenberg

Für die Wissenschaft.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
2. EINLEITUNG	3
2.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	3
2.2 Risikofaktoren des KRKs.....	3
2.3 Klassifikation des KRKs	4
2.3.1 UICC-Stadium I.....	4
2.3.2 UICC-Stadium II	4
2.3.3 UICC-Stadium III	5
2.4 Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms.....	5
2.4.1 Primäre Chemotherapie-Regime	5
2.4.2 Checkpoint-Inhibitoren als Erstlinientherapie.....	6
2.4.3 Therapieregime molekularpathologischer Subgruppen.....	6
2.5 Kolorektale Lebermetastasen	7
2.5.1 Epidemiologie von kolorektalen Metastasen.....	7
2.5.2 Resektabilität der KRLM.....	7
2.5.3 Operative Strategien bei synchronen KRLM	8
2.5.4 Operative Techniken zur Entfernung von KRLM	8
2.6 Ablative Methoden.....	10
2.6.1 Thermische Techniken.....	11
2.6.1.1 RFA.....	11

2.6.1.2 MWA	12
2.6.1.3 Andere thermische Techniken	12
2.6.2 Nicht-thermische Techniken.....	13
2.6.3 Nachteile von RFA und MWA.....	13
2.7 Elektrochemotherapie	14
2.7.1 Reversible Elektroporation	14
2.7.2 Wirkmechanismus der ECT.....	14
2.7.3 Applikationsweg der Medikamente	15
2.7.4 Anwendung der ECT	16
2.7.4.1 Anwendung der ECT bei kutanen und subkutanen Tumoren.....	16
2.7.4.2 Anwendung der ECT bei tief sitzenden Tumoren	17
2.8 Wahl der chemotherapeutischen Substanzen für diese Studie	18
2.8.1 BLM.....	18
2.8.2 OXP	18
2.8.3 BVZ	19
2.9 Fragestellungen und Ziele der Arbeit.....	19
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 Tiermodell und rechtliche Grundlage	21
3.2 Hygienemanagement und Schutzmaßnahmen bei der Haltung spezifiziert pathogenfreier (SPF) Ratten	21
3.3 Kennzeichnung der Käfige und Tiere in den Experimenten.....	22
3.4 Experimentelles Protokoll und Ablauf.....	22
3.5 Tumorzell-Implantation im Tiermodell	23
3.6 Durchführung der ECT	26

3.7	Ultraschall und photoakustische Bildgebung.....	28
3.8	Auswertung und statistische Verfahren	31
3.8.1	Histopathologische Untersuchung.....	31
3.8.2	Immunhistochemische Analyse	32
3.8.3	Serologische Untersuchungen	33
3.8.4	Statistische Auswertung und Datenanalyse	34
4.	ERGEBNISSE	36
4.1	Tumorentwicklung und allgemeiner Gesundheitszustand der Tiere.....	36
4.2	Ultraschall und photoakustische Bildgebung.....	37
4.2.1	SO ₂ - und HbT-Werte vor der Intervention	37
4.2.2	SO ₂ - und HbT-Werte nach der Intervention	38
4.3	Nekrose des Tumorgewebes	42
4.4	Tumorzellproliferation	46
4.5	Apoptose	48
4.6	Entzündungsreaktion.....	50
4.7	Angiogenese.....	52
4.8	Serologische Untersuchungen.....	54
4.9	Unerwünschte Ereignisse	56
5.	DISKUSSION	57
5.1	Interpretation der Nekrose und des apoptotischen Zelltodes	57
5.2	Interpretation der Ultraschall- und photoakustischen Bildgebung.....	58
5.3	Interpretation der Angiogenese	61

5.4 Allgemeiner Gesundheitszustand der Tiere	62
5.5 Limitationen der Arbeit.....	63
5.6 Schlussfolgerung	64
6. LITERATURVERZEICHNIS	65
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	84
8. TABELLENVERZEICHNIS	86
9. ANHANG	87
10. PUBLIKATIONEN/DANK	105
10.1 Publikationen.....	105
10.2 Dank	106
11. LEBENSLAUF	107

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
λ	Wellenlänge
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
5-FU	5-Fluorouracil
AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AH	Anatomische Hepatektomie
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALPPS	Associating Liver Partition with Portal vein ligation for Staged hepatectomy (In-Situ-Split-Resektion)
ANOVA	Analysis of variance
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BRAF	V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA1	Breast Cancer 1
BVZ	Bevacizumab
CD31	Cluster of Differentiation 31
cm	Zentimeter
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DACH	Diaminocyclohexan
dB	Dezibel
dMMR	Defiziente Mismatch-Reparatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
EASL	European Association for the Study of the Liver

ECT	Elektrochemotherapie
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EP	Elektroporation
ESOPE	European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy
FLR	Future Liver Remnant
FOLFIRI	Folinsäure/5-Fluorouracil/Irinotecan
FOLFOX	Folinsäure/5-Fluorouracil/Oxaliplatin
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIFU	Hochintensiver fokussierter Ultraschall
HNSCC	Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma
HPF	High Power Field
HSI	Hepatic Sinusoidal Injury (Hepatische sinusoidale Schädigung)
HVE	Hepatic Vein Embolization
Hz	Hertz
i.t.	Intratumoral
i.v.	Intravenös
ICD	International Classification of Diseases
Ig	Immunglobulin
IRE	Irreversible Elektroporation
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
KRK	Kolorektales Karzinom
KRLM	Kolorektale Lebermetastasen

LITT	Laserinduzierte Thermotherapie
LTP	Lokale Tumorprogrssion
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
mKRR	Metastasiertes kolorektales Karzinom
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI-H	Hochgradige Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
MWA	Mikrowellenablation
NIH	National Institutes of Health
nm	Nanometer
NMSC	Non-melanoma skin cancer
ns	Nanosekunden
O₂	Sauerstoff
OLT	Orthotope Lebertransplantation
OS	Overall survival (Gesamtüberleben)
OSH	One-stage hepatectomy (einzeitige Hepatektomie)
OXP	Oxaliplatin
p	Empirisches Signifikanzniveau
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PEI	Perkutane Ethanolinjektion
PFS	Progression-free survival (Progressionsfreies Überleben)
pMMR	Profizienter Mismatch-Reparatur
pO₂	Sauerstoffpartialdruck

PSH	Parenchym sparende Hepatektomie
PVE	Portal Vein Embolization
RAS	Rat sarcoma viral oncogene
RE	Reversible Elektroporation
RFA	Radiofrequenzablation
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standard error of mean
SOS	Sinusoidales Obstruktionssyndrom
SPF	Spezifiziert pathogenfrei
STS	Soft-tissue sarcoma
TNM	Tumor-Node-Metastasis
TSH	Two-stage hepatectomy (zweizeitige Hepatektomie)
U	Unit
UC	Colitis Ulcerosa
UICC	Union for International Cancer Control
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WAG/Rij	Wistar Albino Glaxo Rijswijk
XELOX	Capecitabin/Oxaliplatin

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

EINLEITUNG: In dieser Studie wurde die Wirksamkeit der Elektrochemotherapie zur Behandlung von kolorektalen Lebermetastasen in einem Rattenmodell untersucht. Die Elektrochemotherapie kombiniert die Verabreichung chemotherapeutischer Substanzen mit reversibler Elektroporation, um die Aufnahme der Medikamente in Tumorzellen durch die lokal applizierten elektrischen Impulse zu verbessern. Ziel der vorliegenden experimentellen Studie ist es, die Wirksamkeit unterschiedlicher Chemotherapie-Schemata zu vergleichen sowie unerwünschte Ereignisse zu dokumentieren, die peri- und postinterventionell auftreten können.

METHODEN: WAG/Rij-Ratten werden randomisiert in drei Gruppen eingeteilt und erhalten acht Tage nach Tumorzell-Implantation eine intravenöse Chemotherapie kombiniert mit reversibler Elektroporation. Gruppe 1 erhält Bleomycin, Gruppe 2 erhält Oxaliplatin und Gruppe 3 erhält Oxaliplatin in Kombination mit Bevacizumab. Ultraschall- und photoakustische Bildgebung erfolgen unmittelbar vor sowie fünf Tage nach der Behandlung zur Messung der Sauerstoffsättigung und der Hämoglobinkonzentration im Tumorgewebe, um Rückschlüsse auf die Tumoroxygenierung und -perfusion zu ermöglichen. Anschließend erfolgen Tumorentnahmen sowie histologische, immunhistochemische und laborchemische Analysen. Die Ergebnisse werden einer statistischen Auswertung unterzogen.

ERGEBNISSE: Bleomycin führte zu einer hochsignifikanten Reduktion der Sauerstoffsättigung im Vergleich zu beiden anderen Gruppen ($p < 0,01$) und zu einer geringeren Angiogenese des Tumors im Vergleich zur Behandlung mit Oxaliplatin-Monotherapie ($p < 0,05$). Die Bildung von nekrotischem Gewebe war unter Bleomycin signifikant erhöht im Vergleich zu den anderen Gruppen ($p < 0,01$). In beiden Oxaliplatin-Gruppen wurden mehr apoptotische Zellen nachgewiesen als in der Bleomycin-Gruppe ($p < 0,01$). Bevacizumab verstärkte die Wirkung von Oxaliplatin und führte in nahezu allen gemessenen Parametern zu besseren Ergebnissen; statistische Signifikanz wurde jedoch ausschließlich bei der Reduktion der Sauerstoffsättigung des Tumorgewebes nach der Behandlung im Vergleich zur Oxaliplatin-Monotherapie beobachtet ($p < 0,05$).

SCHLUSSFOLGERUNG: Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass alle drei Behandlungsoptionen sicher und effektiv bei kolorektalen Lebermetastasen in einem Rattenmodell sind. Bleomycin erwies sich jedoch als die effektivste Therapieoption in dieser Studie, während die Kombination von Bevacizumab mit Oxaliplatin zu einer Verbesserung der getesteten Parameter im Vergleich zur alleinigen Anwendung von Oxaliplatin führte.

1.2 Abstract

TITLE: Electrochemotherapy with intravenous administration of bleomycin, oxaliplatin, and oxaliplatin in combination with bevacizumab for the treatment of hepatic metastases of colorectal cancer in a rat model

INTRODUCTION: This study investigates the efficacy of electrochemotherapy for the treatment of colorectal liver metastases in a rat model. Electrochemotherapy combines the administration of chemotherapeutic agents with reversible electroporation, in order to enhance drug uptake into tumor cells through locally applied electric pulses. The aim of the present experimental study is to compare the efficacy of different chemotherapy regimens and to document any adverse events that may occur peri- and post-intervention.

METHODS: WAG/Rij rats are randomized into three groups and receive intravenous chemotherapy combined with reversible electroporation eight days after tumor cell implantation. Group 1 receives bleomycin, group 2 receives oxaliplatin, and group 3 receives oxaliplatin in combination with bevacizumab. Ultrasound and photoacoustic imaging are performed immediately before and five days after treatment to measure tumor tissue oxygen saturation and hemoglobin concentration, allowing conclusions tumor oxygenation and perfusion. Tumor samples are subsequently collected for histological, immunohistochemical, and blood analyses. The results are subjected to statistical evaluation.

RESULTS: Bleomycin resulted in a highly significant reduction in oxygen saturation compared with both other groups ($p < 0.01$) and a marked decrease in tumor angiogenesis compared with oxaliplatin monotherapy ($p < 0.05$). The formation of necrotic tissue was significantly increased in the bleomycin group compared with the other groups ($p < 0.01$). Both groups treated with oxaliplatin exhibited a higher number of apoptotic cells than the bleomycin group ($p < 0.01$). Bevacizumab enhanced the effect of oxaliplatin, achieving better results in nearly all measured parameters; however, statistical significance was only observed for the post-treatment reduction in tumor tissue oxygen saturation compared with oxaliplatin monotherapy ($p < 0.05$).

CONCLUSION: The findings suggest that all three treatment options are safe and effective for colorectal liver metastases in a rat model. Bleomycin proved to be the most effective treatment option in this study, whereas the addition of bevacizumab to oxaliplatin resulted in improvements in the evaluated parameters compared with oxaliplatin alone.

2. Einleitung

2.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (KRK), einschließlich der Karzinome des Kolons, des Rektums und des Anus (ICD-10-Kodierungen C18-C21), stellt weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung dar, mit einer geschätzten Inzidenz von 1,9 Millionen Diagnosen im Jahr 2022. Zudem ist es mit 904.000 Todesfällen im selben Jahr die zweithäufigste Todesursache unter den Krebserkrankungen (BRAY et al., 2024). Zwischen 2012 und 2018 stieg die altersstandardisierte Inzidenzrate des KRKs von 17,2 auf 19,7 pro 100.000 Personenjahre, während die altersstandardisierte Mortalitätsrate von 8,3 auf 8,9 pro 100.000 Personenjahre zunahm. Dies entsprach etwa 10% aller globalen Krebsinzidenzen und -mortalitäten (BAIDOUN et al., 2021). Prognosen zufolge wird, bedingt durch demografische Veränderungen, die Anzahl neuer KRK-Fälle bis 2035 um 79% ansteigen und somit über 2,4 Millionen erreichen (FERLAY et al., 2015).

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate hat sich in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich verbessert und liegt nun in den wohlhabendsten Ländern, einschließlich der USA, bei über 65% (JEMAL et al., 2017). In Deutschland lagen die relativen 5-Jahres-Überlebensraten bei Frauen bei etwa 63% und bei Männern bei etwa 62%, was vergleichbare Werte wie in den USA aufweist (KOCH-INSTITUT und E.V., 2019). Jedoch bleiben die Überlebensraten in vielen Regionen der Welt, einschließlich einiger europäischer Länder, nach wie vor signifikant niedriger (HOLLECZEK et al., 2015).

Der wichtigste prognostische Faktor ist das Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose. Die größten Verbesserungen der Überlebensraten wurden bei KRK im regionalen und metastasierten Stadium verzeichnet. So stieg die 5-Jahres-Überlebensrate für regionale Stadien des KRKs von 55% auf 74% und für das Rektumkarzinom von 45% auf 70% im Zeitraum von 1975 bis 2012, was vor allem auf Fortschritte in der adjuvanten Therapie und chirurgischen Behandlung zurückzuführen ist. Bei Patienten mit metastasierten Tumoren erhöhte sich die 2-Jahres-Überlebensrate von 21% auf 35% beim KRK und von 22% auf 39% beim Rektumkarzinom, wenngleich der Fortschritt für bestimmte Patientengruppen, molekulare Subtypen und Tumorlokalisationen langsamer voranschritt (SIEGEL et al., 2017).

2.2 Risikofaktoren des KRKs

Das Risiko für Darmkrebs nimmt mit dem Alter deutlich zu und das durchschnittliche Diagnosealter liegt in entwickelten Ländern bei etwa 70 Jahren (BRENNER und CHEN, 2018). Neben dem Alter existieren weitere gut etablierte Risikofaktoren, darunter männliches Geschlecht, Tabakkonsum, exzessiver Alkoholkonsum, physische Inaktivität, hoher Verzehr von rotem und verarbeitetem Fleisch sowie Adipositas. (BAIDOUN et al., 2021). Diese Faktoren tragen zur erhöhten Inzidenz und Mortalität von Darmkrebs bei (BRENNER und CHEN, 2018). Entzündliche Darmerkrankungen, insbesondere Colitis ulcerosa (UC), erhöhen auch das Risiko für KRK im Verlauf der Erkrankung. Patienten mit UC zeigen

im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein um 60% erhöhtes Risiko (HERRINTON et al., 2012). Die langanhaltende entzündliche Aktivität bei UC ist an etwa 1% aller KRK-Fälle beteiligt und das Risiko steigt mit der Dauer der Erkrankung (YASHIRO, 2014). Studien zeigen uneinheitliche Ergebnisse hinsichtlich des erhöhten KRK-Risikos bei UC-Patienten, was auf Unterschiede in Studiendesign und klinischen Kriterien zurückgeführt werden kann (GRIVENNIKOV, 2013; GYDE et al., 1988; WINTHER et al., 2004).

2.3 Klassifikation des KRKs

Die Klassifikation des KRKs hat eine entscheidende Bedeutung für die präzise Risikostratifizierung und die Auswahl geeigneter Therapiestrategien. Die international am weitesten verbreitete Klassifikation ist die Tumor-Node-Metastasis (TNM)-Klassifikation, die von der Union for International Cancer Control (UICC) und dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) entwickelt wurde (AMIN et al., 2017; BRIERLEY et al., 2017). Die aktuelle TNM-Klassifikation der AJCC basiert auf der Beurteilung der Tumorausdehnung (T), dem Befall regionaler Lymphknoten (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Sie bietet eine standardisierte Methode zur Beschreibung des Tumorstadiums und ermöglicht die Bewertung der Krankheitsprogression. Diese Einteilung bildet die Grundlage für therapeutische Entscheidungen und die Prognoseabschätzung bei KRK-Patienten (AMIN et al., 2017). Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Klassifikation des KRKs ist das Grading des Tumors, um den histologischen Differenzierungsgrad zu bestimmen (BRIERLEY et al., 2017; HAMILTON et al., 2010).

2.3.1 UICC-Stadium I

Für das Stadium I KRK (T1-2, N0, M0) ist die chirurgische Resektion oft kurativ und erfordert in der Regel keine adjuvante Therapie (ALONSO und SALTZ, 2021; GMEINER, 2024).

2.3.2 UICC-Stadium II

Im Stadium II (T3-4, N0, M0), das eine tiefere Invasion in die Darmwand oder nahe gelegene Strukturen einschließt, ist der Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie umstritten. Für Patienten im Stadium II und niedrigem Risiko wird eine adjuvante Therapie nicht empfohlen, wegen der unzureichenden überzeugenden Evidenz für einen therapeutischen Nutzen (ALONSO und SALTZ, 2021). Für Patienten im Stadium II und hohem Risiko stellen drei Monate Capecitabin in Kombination mit Oxaliplatin (XELOX) oder sechs Monate Capecitabin als Monotherapie angemessene Behandlungsoptionen dar (GROTHEY et al., 2018). Hochrisikomerkmale wie T4-Läsionen, schlechte Differenzierung, lymphovaskuläre Invasion und unzureichende Lymphknotenentnahme können den Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie zur Reduzierung des Rezidivrisikos rechtfertigen (ALONSO und SALTZ, 2021; BAXTER et al., 2022). Die Zugabe von Oxaliplatin (OXP) bei Stadium II und hohem Risiko hat keinen eindeutigen Nutzen nachgewiesen (YOTHERS et al., 2011).

2.3.3 UICC-Stadium III

Im Stadium III (jegliches T, N1-2, M0), das durch regionale Lymphknotenbefall gekennzeichnet ist, profitieren Patienten von adjuvanter Chemotherapie nach chirurgischer Resektion (ALONSO und SALTZ, 2021). 5-Fluorouracil (5-FU) hat sich als wirksam erwiesen, um das Gesamtüberleben (overall survival, OS) bei Patienten mit reseziertem KRK zu verbessern (LAURIE et al., 1989). Die Kombination von 5-FU mit Leucovorin über einen Zeitraum von 6 Monaten zeigte vergleichbare Effektivität im Vergleich zu längeren Behandlungszeiträumen mit 5-FU und Levamisol (HALLER et al., 2005). Studiendaten belegen außerdem, dass Capecitabin hinsichtlich seiner Wirksamkeit der Standardtherapie mit 5-FU/Leucovorin entspricht (VAN CUTSEM et al., 2001).

5-FU gehört zu den am häufigsten mit OXP kombinierten chemotherapeutischen Substanzen, da die Hemmung der Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) den Abbau von 5-FU verlangsamt (FISCHEL et al., 2002). Die MOSAIC-Studie zeigte zudem, dass die Zugabe von OXP zur 5-FU/Leucovorin-Therapie (FOLFOX4) über 6 Monate im Vergleich zur alleinigen Gabe von 5-FU/Leucovorin als Bolus alle 2 Wochen (LV5FU2) das Rezidivrisiko nach 3 Jahren reduzierte (ANDRÉ et al., 2004). Eine Post-hoc-Analyse dieser Studie belegte eine Verbesserung der 10-Jahres-Überlebensrate bei Patienten im Stadium III, die mit der OXP-basierten Therapie behandelt wurden (ANDRÉ et al., 2015).

2.4 Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms

Die Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms (mKRK) umfasst eine Vielzahl von therapeutischen Optionen.

2.4.1 Primäre Chemotherapie-Regime

Die Erstlinientherapie bei mKRK umfasst in der Regel eine Kombinationschemotherapie mit 5-FU als Dauerinfusion, Leucovorin und entweder Irinotecan (FOLFIRI) oder OXP (FOLFOX) (DE GRAMONT et al., 2023; DOUILLARD et al., 2000). Bei mKRK hat sich die Kombinationstherapie FOLFOX im Vergleich zur alleinigen Anwendung von 5-FU und Leucovorin als besonders vorteilhaft erwiesen, da sie höhere Ansprechraten sowie eine deutliche Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (progression-free survival, PFS) ermöglicht (DE GRAMONT et al., 2000). Laut der American Society of Clinical Oncology (ASCO)-Leitlinie von 2023 zur Behandlung des mKRKs sollten Patienten mit Mikrosatellitenstabilität (MSS) oder profizienter Mismatch-Reparatur (pMMR) als Erstlinientherapie mit der Chemotherapie-Doublette FOLFOX oder FOLFIRI oder mit der Chemotherapie-Triplette FOLFOXIRI behandelt werden (MORRIS et al., 2023). FOLFOX kommt nicht nur in der primären Therapie zum Einsatz, sondern auch im neoadjuvanten und adjuvanten Kontext (ANDRÉ et al., 2009; YANG et al., 2016).

2.4.2 Checkpoint-Inhibitoren als Erstlinientherapie

Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1)- und/oder Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA-4)-Inhibitoren werden nach dem Versagen der Erstlinientherapie empfohlen, wobei sowohl die Monotherapie mit Anti-PD-1 als auch die Kombinationstherapie mit Anti-PD-1/CTLA-4 als evidenzbasierte Erstlinientherapien unterstützt werden (BENSON et al., 2021; BROMHAM et al., 2020; VAN CUTSEM et al., 2016). Die PD-1-Kaskade hemmt die T-Zell-Aktivierung und ist für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz verantwortlich (MAKUKU et al., 2021). Ihre Blockade durch monoklonale Antikörper kann jedoch die antitumorale Aktivität der T-Zellen fördern (ARASANZ et al., 2017). Ebenso stellt die Blockade von CTLA-4 durch monoklonale Antikörper eine vielversprechende Strategie in der Immuntherapie des KRKs dar (SALTZ, 2009). Die CTLA-4-Antikörper binden sich an die CTLA-4/B7-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen, was die T-Zell-Aktivität verlängert und gleichzeitig die T-Zell-Aktivierung verstärkt (LYNCH und MURPHY, 2016).

In einer Phase-III-randomisierten kontrollierten Studie von 2020 wurde Pembrolizumab, ein monoklonaler Antikörper aus der Klasse der PD-1-Inhibitoren, mit den Standard-Chemotherapieschemata verglichen (ANDRÉ et al., 2020). Die Studie zeigte, dass Pembrolizumab als Erstlinientherapie bei mKRK mit hochgradiger Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) oder defizienter Mismatch-Reparatur (dMMR) signifikant längere PFS bewirkte. In einer abschließenden Analyse derselben Studie wurden die Befunde unterstützt, dass Pembrolizumab eine effektive Erstlinientherapie für diese Patientengruppe sein könnte (DIAZ et al., 2022).

Ipilimumab, ein CTLA-4-Inhibitor, in Kombination mit Nivolumab, einem monoklonalen Antikörper aus der Gruppe der PD-1-Inhibitoren, zeigte eine hohe antitumorale Ansprechrates bei Patienten mit dMMR oder MSI-H mKRK (OVERMAN et al., 2018b). Diese Fortschritte in der Immuntherapie haben das OS bei mKRK-Patienten erheblich verbessert (TOH et al., 2016).

2.4.3 Therapieregime molekularpathologischer Subgruppen

Zielgerichtete Therapien wie die Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab sowie der monoklonale Antikörper gegen den Endothelwachstumsfaktor-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A, VEGF-A), Bevacizumab (BVZ), können auch in Kombination mit den primären Chemotherapie-Regimen als Erstlinientherapie eingesetzt werden (SALTZ et al., 2008; VAN CUTSEM et al., 2009). Patienten mit einem linksseitigen RAS-Wildtyp Karzinom und MSS- oder pMMR-Status profitieren von der Zugabe von Anti-EGFR zu der Chemotherapie. Allerdings zeigte die Kombination von BVZ und Chemotherapie bei Patienten mit einem rechtsseitigen RAS-Wildtyp Karzinom und MSS- oder pMMR-Status ein verlängertes PFS (CILIBERTO et al., 2018). Karzinome mit einer RAS-Mutation profitieren aufgrund von Resistenzmechanismen nicht von einer zusätzlichen Anti-EGFR-Behandlung (BOKEMEYER et al., 2015; DOUILLARD et al., 2013; VAN CUTSEM et al., 2015). Die Zugabe von BVZ wird auch nicht empfohlen, da es vergleichbare

Überlebenszeiten wie Cetuximab in Kombination mit Chemotherapie gezeigt hat (STINTZING et al., 2012). Die Chemotherapie-Triplette FOLFOXIRI zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den Chemotherapie-Doubletten bei RAS-Mutationen (CREMOLINI et al., 2015). Im Gegensatz dazu zeigen Karzinome, die eine V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF)-V600E-Mutation aufweisen, ein therapeutisches Ansprechen auf eine Kombination aus Anti-EGFR-Behandlung und Encorafenib, vorausgesetzt, dass sie zuvor mit Chemotherapie behandelt wurden. (VAN CUTSEM et al., 2019).

2.5 Kolorektale Lebermetastasen

2.5.1 Epidemiologie von kolorektalen Metastasen

Kolorektale Lebermetastasen (KRLM) treten bei etwa 50% der Patienten mit KRK auf, während 15 bis 25% der Patienten bei der Erstdiagnose bereits Lebermetastasen aufweisen (FRÜHLING et al., 2023; MARTIN et al., 2020). KRLM können hinsichtlich des Diagnosezeitpunkts in synchrone und metachrone Metastasen unterteilt werden. Synchrone KRLM sind Lebermetastasen, die zum Zeitpunkt oder vor der Diagnose des primären kolorektalen Tumors identifiziert wurden. KRLM, die nach der Diagnose oder der Resektion des primären kolorektalen Tumors entdeckt wurden, werden als metachrone KRLM bezeichnet (ADAM et al., 2015). KRLM treten häufiger bei männlichen Patienten und bei Patienten mit linksseitigem KRK auf, was auf den embryologischen Ursprung des Primärtumors zurückzuführen ist (ENGSTRAND et al., 2018; MANFREDI et al., 2006). Die Manifestation metachroner KRLM erfolgt bei bis zu 85,3% der Patienten innerhalb eines Jahres und bis zu 97,5% innerhalb von drei Jahren, wobei 30-40% dieser Fälle auf die Leber beschränkt sind (CHONG und CUNNINGHAM, 2005; ELFERINK et al., 2015).

2.5.2 Resektabilität der KRLM

Um die Resektabilität der KRLM zu beurteilen, spielen multidisziplinäre Expertenteams eine entscheidende Rolle (VAN CUTSEM et al., 2016). Die meisten Patienten präsentieren sich häufig mit einer initial nicht resezierbaren Erkrankung und weisen eine ungünstige Tumorbiologie auf (ADAM et al., 2015). KRLM können in folgende drei Kategorien unterteilt werden: "Resektabel", "grenzwertig resektabel" und "nicht resektabel" (CHARNSANGAVEJ et al., 2006; GONZÁLEZ und FIGUERAS, 2007; IVEY et al., 2022; KACZIREK, 2017).

"Resektabel" bedeutet, dass die metastasierten Tumore vollständig entfernt werden können, sofern die Leberfunktion ausreichend ist und mindestens 20% des geschätzten gesamten Lebervolumens erhalten bleiben (CHARNSANGAVEJ et al., 2006).

"Grenzwertig resektabel" beschreibt Situationen, in denen eine vollständige Entfernung theoretisch möglich ist. Allerdings bestehen potenziell technische Herausforderungen, wie eine reduzierte Wahrscheinlichkeit einer R0-Resektion, sowie biologische Herausforderungen, wie zahlreiche

Lebermetastasen, Anzeichen einer Krankheitsprogression und mögliche extrahepatische Metastasen (KACZIREK, 2017).

Der Begriff “nicht resektabel” deutet darauf hin, dass die Metastasen aufgrund einer Ausdehnung auf mehr als 70% der Leberoberfläche oder auf mehr als sechs Lebersegmente sowie einer umfassenden Invasion von Gefäßen wie der Vena portae hepatis oder der Venae hepaticae nicht chirurgisch entfernt werden können. (GONZÁLEZ und FIGUERAS, 2007).

Konversionsschemata für nicht resezierbare KRLM wurden entwickelt, die sowohl Chemotherapeutika als auch Inhibitoren von Zellrezeptoren umfassen, die am Tumorwachstum und dessen Regulation beteiligt sind. Cetuximab, BVZ und Panitumumab wurden in Kombination mit FOLFOX oder FOLFIRI verwendet, was die objektive Ansprechrate auf 68% im Vergleich zu 57% bei alleiniger Chemotherapie erhöhte. Diese gesteigerten Ansprechraten führten zu einer Konversionsrate von 38% bei zuvor nicht resezierbaren KRLM, verglichen mit 30% nach alleiniger Chemotherapie (COLETTI et al., 2017).

2.5.3 Operative Strategien bei synchronen KRLM

Für Patienten mit synchronen KRLM gibt es aktuell drei etablierte Behandlungsstrategien, bei denen eine kurative Intention als machbar angesehen wird. Diese beinhalten die “colorectal-first”-Strategie, die “liver-first”-Strategie, sowie das simultane Vorgehen (FRÜHLING et al., 2023).

Bei der “colorectal-first”-Strategie wird zunächst der Primärtumor behandelt, gefolgt von der Entfernung der Lebermetastasen in einem zweiten Eingriff (FRÜHLING et al., 2023). Diese Strategie wird insbesondere bei Patienten mit erhöhtem Risiko für Darmobstruktion, Perforation und Blutung angewandt (ADAM et al., 2015; ALLEN et al., 2003).

Im Gegensatz dazu werden bei der “liver-first”-Strategie zuerst die Lebermetastasen und im Anschluss der Primärtumor entfernt (FRÜHLING et al., 2023). Die “liver-first”-Strategie wird vorwiegend bei Patienten mit fortgeschrittener Leberbeteiligung angewendet, bei denen die KRLM “grenzwertig resektabel” sind oder bei denen eine Operation erst durch eine neoadjuvante Chemotherapie ermöglicht wurde (MENTHA et al., 2006).

Bei dem simultanen Vorgehen werden sowohl der Primärtumor als auch die Metastasen in einem einzigen Eingriff entfernt. In einer Studie von Frühling et al., konnte kein negativer Zusammenhang zwischen dem simultanen Vorgehen und den anderen beiden Strategien in Bezug auf Morbidität, Mortalität oder das OS festgestellt werden (FRÜHLING et al., 2023).

2.5.4 Operative Techniken zur Entfernung von KRLM

Aktuell stehen verschiedene operative Techniken zur Entfernung von KRLM zur Verfügung. Zu den etablierten Verfahren gehören die parenchymsparende Hepatektomie (PSH), sowie die anatomische Hepatektomie (AH). Weitere Optionen sind die einzeitige (one-stage hepatectomy, OSH) und die zweizeitige (two-stage hepatectomy, TSH) Hepatektomie, sowie die In-Situ-Split-Resektion (Associating Liver

Partition with Portal vein ligation for Staged hepatectomy, ALPPS) (GÄBELEIN und GLANEMANN, 2019). In besonderen Fällen kann auch eine orthotope Lebertransplantation (OLT) in Erwägung gezogen werden (BYRNE et al., 2025). Jede dieser Techniken wird individuell auf die Bedürfnisse und den Zustand des Patienten abgestimmt (IVEY et al., 2022).

Die AH wurde ursprünglich zur Behandlung von KRLM eingesetzt. Obwohl diese Methode selbst bei kleinen Metastasen zu einem erheblichen Verlust an Lebergewebe führte, wurde sie aufgrund ihrer technischen Einfachheit und der Möglichkeit, einen ausreichenden Sicherheitsabstand zu gewährleisten, weiterhin angewandt (ADSON und VAN HEERDEN, 1980).

Die PSH gilt heutzutage als der Goldstandard in der chirurgischen Behandlung von resektablen KRLM und basiert auf dem Prinzip der Schonung nicht-tumorösen Lebergewebes (EVRARD et al., 2018; MORIS et al., 2017). Diese Technik ist mit einer reduzierten postoperativen Morbidität und verkürzten Krankenhausaufenthalten assoziiert, was auf den geringeren perioperativen Blutverlust und die deutlich kürzere Operationszeit zurückzuführen ist (ANDREOU et al., 2021; DENG et al., 2019; KOOBY et al., 2003). Die PSH-Technik kann sowohl bei unilobärem als auch bei bilobärem Befall angewendet werden. Sie kann bei synchronen KRLM im “colorectal-first”-, “liver-first”- oder simultanen Ansatz durchgeführt werden. Bei metachronen KRLM kann sie auch allein angewendet werden, entweder mit oder ohne perioperative systemische Therapie (IVEY et al., 2022).

Bei der OSH werden alle KRLM in einem einzigen Eingriff entfernt. Diese Methode kann mit oder ohne präoperativen Techniken durchgeführt werden. Ist das verbleibende postoperative Restvolumen der Leber (Future Liver Remnant, FLR) kleiner als 30%, kann eine Pfortaderembolisation (PVE) mit oder ohne hepatische Venenembolisation (HVE) zur Induktion von Hypertrophie als präoperative Maßnahme erforderlich sein. Die OSH wird selten bei bilobärem Befall angewendet. Sie kann bei synchronen KRLM, wie bei der PSH, im “colorectal-first”-, “liver-first”- oder simultanen Ansatz durchgeführt werden. Bei metachronen KRLM kann sie ebenfalls allein oder mit perioperativer systemischer Therapie, angewendet werden. (IVEY et al., 2022).

Bei der TSH werden zwei aufeinanderfolgende Leberoperationen durchgeführt. Bei der ersten Operation wird das geplante FLR von Metastasen befreit und die kontralaterale Pfortader wird mittels PVE embolisiert oder mittels HVE ligiert, um eine Hypertrophie des FLRs zu fördern. Nach ausreichender Hypertrophie erfolgt die zweite Leberresektion, bei der die verbleibenden Metastasen entfernt werden. Diese Methode nutzt die Regenerationsfähigkeit der Leber und bietet insbesondere bei Patienten mit bilobärer Erkrankung eine Heilungschance. Sie wird häufiger bei synchronen KRLM im “liver-first”- oder simultanen Ansatz durchgeführt. Bei metachronen KRLM kann sie ebenfalls allein angewendet werden, entweder mit oder ohne perioperative systemische Therapie. Beim simultanen Verfahren bei synchronen KRLM erfolgt typischerweise die Resektion des Primärtumors während der ersten Leberresektion (IVEY et al., 2022).

Die ALPPS, auch bekannt als In-Situ-Split-Resektion, ist ein zweizeitiges Verfahren zur Resektion von initial inoperablen KRLM. Bei dem ersten Eingriff wird das geplante FLR von pathologischem Gewebe befreit. Dies erfolgt durch eine Ligatur der kontralateralen Pfortader, kombiniert mit einer Parenchymdissektion der rechten und linken Leberhälfte (In-Situ-Split). Sobald eine ausreichende Hypertrophie des FLR erreicht ist, wird bei dem zweiten Eingriff das tumorbefallene Lebergewebe ipsilateral der Pfortaderligatur entfernt (IVEY et al., 2022). Im Vergleich zur TSH kann die ALPPS durch die Partitionierung des Leberparenchyms möglicherweise eine beschleunigte Regeneration des FLR bewirken und die Zeitspanne zwischen den beiden Eingriffen verkürzen (DE SANTIBAÑES und CLAVIEN, 2012; SCHNITZBAUER et al., 2012). Darüber hinaus könnte die ALPPS potenziell das Risiko einer Tumorrinvasion in das verbleibende Lebergewebe reduzieren (SCHNITZBAUER et al., 2012). Studien zeigten, dass das Leberparenchym bei ALPPS mit einer geschätzten Rate von 22 bis 35 ml pro Tag regenerierte, was eine Zeitspanne von nur 7 bis 13 Tagen zwischen den Eingriffen ermöglichte. Im Vergleich dazu betrug die Regenerationsrate bei der TSH nach der PVE lediglich 3 bis 5 ml pro Tag, was eine Zeitspanne von 5 bis 10 Wochen zwischen den beiden Eingriffen erforderte (ADAM et al., 2016; SCHADDE et al., 2014).

Bei der OLT wird die tumorbefallene Leber durch eine gesunde von einem Spender ersetzt. Diese Methode wird bei KRLM selten durchgeführt, kann jedoch bestimmten Patienten Vorteile bieten (DUELAND et al., 2021; SIMONEAU et al., 2019). Die OLT wird bevorzugt für Patienten mit spezifischen Merkmalen wie linksseitigen Primärtumoren oder RAS-Mutationen empfohlen, ist jedoch nicht geeignet für Patienten mit BRAF-V600E-Mutationen (BONNEY et al., 2021).

2.6 Ablative Methoden

Ablationstherapien stellen eine neuere Behandlungsoption für KRLM dar, die darauf abzielen die Krankheitsprogression zu kontrollieren. In Kombination mit systemischer Therapie können sie die Überlebensraten verbessern und gelegentlich mit chirurgischer Resektion oder Chemotherapie kombiniert werden, um eine Tumorreduktion zu ermöglichen (VAN CUTSEM et al., 2016). In einigen Fällen können Ablationstechniken gleichzeitig mit der chirurgischen Resektion oder als Konversionstherapie in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt werden, wodurch eine Resektion nach Tumor-Downstaging ermöglicht wird.

Für die Behandlung KRLM stehen mehrere Ablationsmethoden zur Verfügung, die in thermische und nicht-thermische Techniken unterteilt werden können. Zu den thermischen Techniken gehören die Radiofrequenzablation (RFA), die Mikrowellenablation (MWA), die laserinduzierte Thermotherapie (LITT), die hochintensive fokussierte Ultraschallablation (HIFU), sowie die Kryoablation. Die nicht-thermischen Techniken umfassen die perkutane Ethanolinjektion (PEI) und die irreversible Elektroporation (IRE) (CHAVEZ et al., 2020). Die RFA und die MWA sind etablierte Verfahren zur Behandlung kleiner, nicht resezierbarer KRLM (GÄBELEIN und GLANEMANN, 2019; PUIJK et al., 2018).

2.6.1 Thermische Techniken

Die RFA und die MWA sind die am häufigsten eingesetzten Ablationstechniken bei Metastasen (CHAVEZ et al., 2020). Beide Methoden stellen sichere und effektive intraoperative Behandlungsoptionen von KRLM dar (KRUL et al., 2022). In der randomisierten CLOCC-Studie wurde die Rolle der RFA bei der Behandlung von nicht resezierbaren KRLM untersucht (RUERS et al., 2017). Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl das OS als auch das PFS in der RFA- und Chemotherapiegruppe signifikant länger waren als in der Gruppe, die lediglich mit Chemotherapie behandelt wurde. Darüber hinaus legen Beobachtungsstudien nahe, dass sowohl RFA als auch MWA in Kombination mit Chirurgie oder Chemotherapie als therapeutische Optionen bei der Behandlung von KRLM in Betracht gezogen werden können (ROCHA und D'ANGELICA, 2010).

2.6.1.1 RFA

Die RFA stellt die erste energiebasierte Ablationsmethode dar, die zur Behandlung von Leberkrebs eingesetzt wurde (GERVAIS und ARELLANO, 2011). Bei der RFA wird der Zelltod durch Reibungshitze verursacht, die durch hochfrequenten Wechselstrom erzeugt wird. Die RFA verwendet Frequenzen von 450 bis 500 kHz in der Nähe der Elektrode (HAEMMERICH und SCHUTT, 2010). Die dabei entstehende Wärme wird zwischen 60°C und 100°C gehalten. Bei Temperaturen von 60 bis 100°C kommt es zu koagulativer Nekrose und damit zum Zelltod (VAN SONNENBERG et al., 2005). Die Tumornekrose wird durch koagulative Nekrose erreicht, die sich auf einen Sicherheitsring im peritumoralen Gewebe erstreckt und dabei kleine, unentdeckte Satelliten eliminiert (GLASSBERG et al., 2019). Thermoelemente sind in die Spitze der Elektroden integriert, wodurch eine kontinuierliche Überwachung der Gewebetemperatur ermöglicht wird. Innerhalb von 15-30 Minuten wird eine Ablationszone von 3-5 cm erreicht (VOGL et al., 2014). Mehrere Ablationen können durchgeführt werden, um das Rezidivrisiko zu verringern. Allerdings sollten erhöhte Temperaturen und verlängerte Ablationszeiten vermieden werden, da das hepatische Gewebe austrocknen kann, was den Stromfluss behindert und die Wirksamkeit der RFA reduziert (ROCHA und D'ANGELICA, 2010). Die Kombination von RFA mit Resektion und/oder systemischer Therapie kann das mediane PFS und das OS verbessern, ohne die Morbidität oder die Mortalität zu erhöhen (RUERS et al., 2012; RUERS et al., 2017; VAN AMERONGEN et al., 2016).

Laut den European Association for the Study of the Liver (EASL)-Richtlinien ist die thermische Ablation mit RFA die Standardbehandlung für Patienten mit Tumoren der Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Stadium 0 und A, die nicht für eine chirurgische Resektion geeignet sind (GALLE et al., 2018). Insbesondere bei Patienten mit BCLC 0-Tumoren kann die RFA als Erstlinientherapie selbst bei resektablem Krebs durchgeführt werden. Das OS nach RFA bei einem sehr frühen hepatozellulären Karzinom (HCC) ist in einem Markov-Modell mit dem der chirurgischen Resektion vergleichbar (CHO et al., 2010). Entsprechend berichtete eine Cochrane-Review von ähnlichen Mortalitätsraten nach RFA und chirurgischer Intervention bei Patienten mit frühem HCC (MAJUMDAR et al., 2017). Darüber hinaus

zeigte eine Meta-Analyse, dass RFA eine kosteneffektive therapeutische Strategie bei Patienten mit bis zu drei Knoten weniger als 3 cm ist (CUCCHETTI et al., 2013). Im Falle von intermediärem HCC können ausgewählte Patienten mit RFA entweder als Monotherapie oder in Kombination behandelt werden (GALLE et al., 2018).

2.6.1.2 MWA

Die MWA ist eine neuere thermische Ablationstechnik im Vergleich zur RFA. Diese Technik nutzt hochfrequente Mikrowellen (915 MHz oder 2,45 GHz), um thermische Energie durch Oszillation von Wassermolekülen im Gewebe zu erzeugen (CHAVEZ et al., 2020; DE BAERE und DESCHAMPS, 2014). Das führt zu einer großen und gleichmäßigen Ablationszone (CHAVEZ et al., 2020). Im Vergleich zur RFA werden bei MWA höhere intratumorale Temperaturen erreicht, was zu einer schnelleren, größeren und homogeneren Ablation führt (GALLE et al., 2018; MARRERO et al., 2018). Im Gegensatz zur RFA wird die durch MWA erzeugte Wärme nicht von verkohltem oder ausgetrocknetem Gewebe beeinflusst, wodurch eine kontrollierte Gewebeablation ermöglicht wird (PATHAK et al., 2011). Diese vorteilhaften Eigenschaften der MWA stehen im Zusammenhang mit niedrigeren Raten an lokalem Rezidiv im Vergleich zur RFA. Allerdings wurden keine Unterschiede im OS zwischen Patienten festgestellt, die mit MWA oder RFA behandelt wurden (CHOW und CHOK, 2019). Diese Methode weist eine geringere Inzidenz von intraoperativem Blutverlust auf und zeigt eine vergleichbare Wirksamkeit zur chirurgischen Resektion (SHIBATA et al., 2000). Moderne MWA-Systeme beinhalten Kühlmechanismen, um Kollateralschäden und Hautverbrennungen zu minimieren (POULOU et al., 2015).

Laut den Empfehlungen der EASL hat MWA vielversprechende Ergebnisse für die lokale Kontrolle bei Patienten mit HCC gezeigt. In Übereinstimmung damit berichteten die Richtlinien der American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), dass MWA potenzielle Vorteile gegenüber RFA aufweist. Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um Sicherheits- und Wirksamkeitsdaten bereitzustellen (MARRERO et al., 2018). Eine von Glassberg et al. durchgeführte Meta-Analyse berichtete von statistisch signifikant reduzierten Raten der lokalen Tumorprogression (LTP) um 30% bei MWA im Vergleich zur RFA (GLASSBERG et al., 2019).

2.6.1.3 Andere thermische Techniken

Die LITT verwendet Laserfasern zur Erhitzung und Ablation von Zielgewebe und kann in Kombination mit der Resektion von KRLM eingesetzt werden, um den chirurgischen Umfang zu reduzieren (GARREAN et al., 2007; VOGL et al., 2014). Diese Methode bietet Vorteile wie die Kompatibilität mit der Magnetresonanztomographie (MRT) und weist eine niedrige Komplikationsrate auf (KNAVEL und BRACE, 2013; VOGL et al., 2014). Einschränkungen umfassen die begrenzte Größe der Ablation sowie den Mangel an umfangreiche Daten zur Bestätigung ihrer Wirksamkeit (FACCIORUSSO et al., 2016; GARREAN et al., 2007).

Die HIFU ist eine nicht-invasive Methode, die Ultraschallwellen mit deutlich höherer Intensität als bei diagnostischen Verfahren verwendet. Diese Technik ermöglicht die Steuerung durch Ultraschall oder MRT und ist besonders geeignet für oberflächliche Tumoren (ZHOU, 2011). Eine klinische Studie in Frankreich bestätigte die Präzision und Sicherheit von HIFU bei der Behandlung von KRLM, wobei minimale Schädigungen des umgebenden Gewebes festgestellt wurden (DUPRE et al., 2015). Dennoch wurden Risiken wie Hautverbrennungen und Schäden an umliegenden Organen dokumentiert (CHAN et al., 2013; JUNG et al., 2011; KIM et al., 2008; LI et al., 2007).

Kryotherapie ist eine Technik, die Kälteschäden durch Frier- und Tautvorgänge verursacht. Bei Kälteeinwirkung bilden sich extrazelluläre Eiskristalle, was zu einer Dehydrierung und ersten reversiblen Zellschädigungen führen kann. Schnelles Einfrieren führt zur Bildung von intrazellulären Eiskristallen, die destruktiv auf Zellmembranen und Zellorganellen wirken (GAGE und BAUST, 1998). Trotz ihrer Wirksamkeit weist die Kryoablation bei der Behandlung von KRLM eine hohe Komplikationsrate (20-30%) auf und kann zu Blutung, Verletzung der Gallenwege und Abszessbildung führen (CHAVEZ et al., 2020; RYAN et al., 2016; SEIFERT und MORRIS, 1999).

2.6.2 Nicht-thermische Techniken

Die PEI stellt eine nicht-thermische, ablativ-technische Technik dar, bei der reiner Alkohol in die Tumoren injiziert wird, was zur Nekrose führt. Zusätzlich kommt es zur Tumorschämie aufgrund der Thrombose kleiner Blutgefäße im Tumorgewebe (GALLE et al., 2018). Obwohl die PEI sicher und effektiv ist, hat sie Einschränkungen wie variable Behandlungszonen, die Notwendigkeit mehrerer Sitzungen und eine höhere lokale Tumorprogressionsrate im Vergleich zu neueren Methoden (YU und BURKE, 2014).

Die IRE erzeugt durch die Anwendung hochspannungsreicher elektrischer Impulse auf Tumorzellen permanente Poren in der Zellmembran und induziert die Apoptose, was zum Zelltod führt (KOETHE et al., 2022). Es werden bis zu 90 Hochspannungsimpulse mit einer Dauer von 20 bis 100 ms und einer Amplitude von bis zu 3000 V verabreicht (GEBBERS et al., 2020). IRE wird gegenüber RFA und MWA bevorzugt, da sie präzise Ablationsränder erzeugt und gleichzeitig benachbarte Gallengänge sowie Blutgefäße bewahrt, während eine erfolgreiche Ablation gewährleistet wird (CHAVEZ et al., 2020; KOETHE et al., 2022).

2.6.3 Nachteile von RFA und MWA

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse, die durch die Anwendung von RFA und MWA erzielt wurden, sind beide Verfahren mit mehreren erheblichen Nachteilen behaftet, die in der klinischen Praxis unbedingt berücksichtigt werden müssen. Eine der wesentlichen Voraussetzungen für den Einsatz dieser Techniken ist, dass die Metastasen eine bestimmte Größe nicht überschreiten und sich nicht in unmittelbarer Nähe großer Gallengänge oder großer Blutgefäße befinden. Beide Methoden, insbesondere die RFA können durch den sogenannten Heat-Sink-Effekt beeinträchtigt werden, der vor allem durch große Blutgefäße hervorgerufen wird (GILLAMS et al., 2015). Der Heat-Sink-Effekt beschreibt die

Wärmeableitung, die auftritt, wenn Blutgefäße mit einem Durchmesser von mehr als 3 mm die Wärme während der Behandlung ableiten, was die Effektivität der Ablation stark verringern kann (MANN et al., 2010).

Im Vergleich zur RFA zeigt die MWA eine geringere Anfälligkeit für diesen Effekt und wird daher aufgrund dieser Eigenschaft zunehmend bevorzugt. Der verminderte Heat-Sink-Effekt bei der MWA trägt dazu bei, dass diese Methode insbesondere in der Nähe von großen Gefäßen und Strukturen erfolgreicher eingesetzt werden kann (CHAVEZ et al., 2020). Dennoch ist es wichtig zu beachten, dass auch die MWA nicht vollständig frei von diesem Effekt ist, was die Wirksamkeit der Ablation in der Nähe von Gefäßen weiterhin einschränken kann. Die Wahl des Verfahrens muss daher individuell abgewogen werden, um die bestmögliche Therapie für den Patienten zu gewährleisten (GALLE et al., 2018).

2.7 Elektrochemotherapie

2.7.1 Reversible Elektroporation

Bei der reversiblen Elektroporation (RE) wird ein Hochspannungsfeld von 100 bis 1000 V angelegt, während bei der IRE, wie zuvor erwähnt, Spannungen von bis zu 3000 V verwendet werden (GEBBERS et al., 2020). Durch die Anwendung elektrischer Impulse werden Poren gebildet, die die Permeabilität der Zellmembran für Mikro- und Makromoleküle, einschließlich Chemotherapeutika, erhöhen (KOSIEK et al., 2012). Die Bildung von Poren und die Destabilisierung der Zellmembran ist vorübergehend, sodass die Zellen in der Lage sind, ihre Homöostase wiederherzustellen (GEBBERS et al., 2020). Durch die RE entfalten Moleküle, die die Zellmembran durchdrangen, ihre Wirkung sowohl auf die Zellen, deren Membran sich wiederhergestellt hat, als auch auf die intakten Zellen (PROBST et al., 2018). Im Gegensatz dazu führt die IRE zu einer Störung der zellulären Homöostase, was aufgrund eines Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration zu Apoptose und Nekrose führt (GISSEL et al., 2011).

In der Medizin wird die Elektroporation (EP) in unterschiedlichen Bereichen angewendet, einschließlich des Gentransfers bei der Gentherapie, der DNA-Impfung sowie der Elektrochemotherapie (ECT) zur Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen. (MIKLAVČIČ et al., 2012).

2.7.2 Wirkmechanismus der ECT

Elektrische Impulse können entweder eine RE oder eine IRE induzieren, wie bereits erläutert wurde. Die ECT basiert auf dem Prinzip der RE in Kombination mit der Verabreichung chemotherapeutischer Wirkstoffe (EDHEMOVIC et al., 2014). Initial wird das chemotherapeutische Medikament intravenös (i.v.) oder intratumoral (i.t.) verabreicht. Nach einer kurzen Zeit werden elektrische Pulse über Elektroden appliziert, die sich um und innerhalb des Tumors positioniert werden (PROBST et al., 2018). Durch die Einwirkung elektrischer Felder kommt es zur Depolarisation der Zellmembran, wodurch Moleküle

wie hydrophile Substanzen die Membran permeieren können (CONDELLO et al., 2022). Innerhalb weniger Minuten normalisiert sich die Membranpermeabilität wieder und die chemotherapeutischen Substanzen verursachen entweder DNA-Strangbrüche oder DNA-Verbindungen in den Tumorzellen. Schließlich führt das chemotherapeutische Mittel zum Zelltod (PROBST et al., 2018).

Es wurde nachgewiesen, dass hydrophile chemotherapeutische Wirkstoffe wie Bleomycin (BLM) oder Cisplatin in Kombination mit EP eine erhöhte Zytotoxizität und Effektivität zeigen, selbst bei geringeren Dosierungen. Insbesondere wurde eine 1000-fache erhöhte Zytotoxizität für BLM und eine 80-fache erhöhte Zytotoxizität für Cisplatin berichtet (PROBST et al., 2018). Im Gegensatz dazu erweist sich die EP bei lipophilen chemotherapeutischen Wirkstoffen wie Irinotecan oder 5-FU als weniger wirksam, da diese Wirkstoffe die Zellmembran aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften leicht durchdringen können (EDHEMOVIC et al., 2014). Zusätzlich zur Reduktion der Wirkstoffkonzentration ermöglicht ECT eine lokal begrenzte Therapie, was sowohl zur Minimierung von Nebenwirkungen als auch zur verbesserten Tumorkontrolle führt (MESCHINI et al., 2012).

Die ECT kann ebenfalls die Endothelzellen der Tumorgefäße beeinflussen und den “vascular disrupting effect” hervorrufen. Die erhöhte Arzneimittelaufnahme in die Endothelzellen führt zu deren Zelltod und infolgedessen zur Unterbrechung des Tumorblutflusses (SERSA et al., 2008). Bei Lebertumoren tritt dieser Effekt jedoch nicht bei größeren Lebergefäßen auf, wodurch eine Behandlung von Tumoren in unmittelbarer Nähe von diesen Gefäßen ermöglicht wird. Dieser Vorteil der ECT hebt sich deutlich von der RFA und der MWA ab, da letztere aufgrund des Heat-Sink-Effekts bei größeren Blutgefäßen an Wirksamkeit verlieren (MIKLAVČIČ et al., 2014).

Ein weiterer Effekt, der als “vascular lock effect” bezeichnet wird, ist durch eine ausgeprägte Vasokonstriktion und eine resultierende verminderte Perfusion im behandelten Gewebe gekennzeichnet (PROBST et al., 2018). Dieser Effekt kann durch zwei Mechanismen erklärt werden: Erstens wird er durch die elektrisch induzierte reflexartige Verengung der Arteriolen, die das Gebiet der EP versorgen, verursacht. Die Vasokonstriktion hält etwa eine bis zwei Minuten an. Zweitens wird er durch die Permeabilität der endothelialen Strukturen bedingt, was zu einem interstitiellen Ödem führt. Das interstitielle Ödem bildet sich zurück, sobald die Membranpermeabilität wiederhergestellt wird (GEHL, 2003). Die Vorteile dieses Effekts umfassen einen minimalen Verlust von Zytostatika während der ECT-Behandlung sowie eine Verringerung der Blutungen bei der Verwendung von invasiver Elektroden (GEBBERS et al., 2020).

2.7.3 Applikationsweg der Medikamente

Bei der ECT können Chemotherapeutika im Prinzip entweder i.t. oder i.v. verabreicht werden (MIKLAVČIČ et al., 2014). Die Wahl des Applikationsweges hängt von verschiedenen Faktoren ab. Bei i.t. Injektionen wird die Dosierung so festgelegt, dass das gesamte Volumen des Tumors vollständig mit dem Wirkstoff behandelt wird. Die Dosierung wird entsprechend der Tumorgöße angepasst, um

eine effektive lokale Therapie sicherzustellen. Im Gegensatz dazu erfolgt die Dosierung von Medikamenten wie BLM bei i.v. Verabreichung auf Basis der Körperoberfläche des Patienten. Dies ermöglicht eine standardisierte Dosierung für die systemische Behandlung. Die Entscheidung über den Applikationsweg wird durch die Anzahl, Größe und Lokalisation der Tumoren sowie durch patientenspezifische Faktoren wie die pulmonale und renale Funktion beeinflusst (GEBOERS et al., 2020; MIKLAVČIČ et al., 2014).

Unsere vorherige experimentelle Studie konnte zeigen, dass die Kombination der i.v. und i.t. Verabreichung von BLM im Vergleich zur alleinigen i.v. oder i.t. Applikation des Chemotherapeutikums keine Verbesserung des onkologischen Ergebnisses bewirkt. Da die i.v. Verabreichung von Chemotherapeutika in der klinischen Praxis als Standardverfahren gilt, wurde empfohlen, den i.v. Zugang als bevorzugte Methode in der ECT beizubehalten (SPILIOTIS et al., 2024).

2.7.4 Anwendung der ECT

ECT kann auf eine Vielzahl maligner Läsionen angewendet werden. Sie erwies sich als wirksam bei der Behandlung von kutanen und subkutanen Metastasen im Kopf- und Halsbereich, Hauttumoren, nicht-melanozytären Hautkrebsarten (NMSC) sowie Hautmetastasen bei Mammakarzinom. Darüber hinaus wird ECT zur Behandlung nicht-kutaner Metastasen in Knochen, Leber und Weichteilsarkomen (soft tissue sarcomas; STS) eingesetzt. Derzeit werden in klinischen Studien auch ihre Anwendungsmöglichkeiten bei Primärtumoren wie Ovarialkarzinom und KRK untersucht (PROBST et al., 2018).

2.7.4.1 Anwendung der ECT bei kutanen und subkutanen Tumoren

Die Wirksamkeit der ECT wurde bei der Behandlung von Hautmetastasen maligner Melanomen, Plattenepithelkarzinomen der Haut, Basalzellkarzinomen, Kaposi-Sarkomen sowie verschiedenen Adenokarzinomen, einschließlich Brust- und Nierenzellkarzinomen, nachgewiesen (SERSA, 2006). Die ESOPÉ-Studie berichtete eine Ansprechrate von 85% bei Hauttumoren. In dieser Studie wurden komplette und partielle Remissionen als Tumorreduktion von über 50% definiert (MARTY et al., 2006). ECT kann bei kutanen und subkutanen Metastasen angewendet werden, wenn eine chirurgische Resektion aufgrund von Kontraindikationen nicht durchführbar ist oder wenn die Metastasen gegen Chemo- und Radiotherapie resistent sind (PROBST et al., 2018).

In vitro und in vivo Studien haben die Wirksamkeit von ECT bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma, HNSCC) nachgewiesen. Diese Tumoren können in verschiedenen anatomischen Strukturen und Organen wie Mund, Nase, Nebenhöhlen, Kehlkopf, Rachen, Speicheldrüsen und Schilddrüse auftreten (CONDELLO et al., 2022). Präklinische Studien an menschlichen radioresistenten Pharynx-Krebszellen bestätigten dass, die zytotoxische Wirkung von BLM in Kombination mit EP verstärkt wurde (ENOKIDA und TAHARA, 2021). Darüber hinaus zeigten Condello et al., dass die Kombination von EP mit Mitomycin C die Apoptose erhöht, indem sie die Autophagie in oralen Plattenepithelkarzinomzellen hemmt (CONDELLO et al., 2021). Bessere

Ergebnisse wurden bei kleinen Läsionen von weniger als 3 cm und bei primären Tumoren erzielt (BERTINO et al., 2016).

ECT zeigte Potenzial zur Behandlung gynäkologischer Tumoren, einschließlich Mammakarzinomen und oberflächlicher Tumoren wie Vulva-Plattenepithelkarzinomen (CONDELLO et al., 2022; MERLO et al., 2021; PERRONE et al., 2021). Im Jahr 2019 zeigten Studien, die Cisplatin in Kombination mit EP einsetzten, vielversprechende Effekte bei resistenten Brustkrebszellen, indem sie die Zellproliferation reduzierten, metabolische Veränderungen induzierten, und die Apoptose förderten. Die Kombination eines PARP-Inhibitors mit EP verbesserte die therapeutische Wirksamkeit in Breast Cancer 1 (BRCA1)-mutierten Zellen (MITTAL et al., 2019). In vivo-Experimente zeigten eine Verzögerung des Tumorwachstums und höhere Überlebensraten bei Mäusen (BOSNJAK et al., 2021). Bislang wurden jedoch keine klinischen Studien bei Patientinnen mit Mammakarzinom durchgeführt (CONDELLO et al., 2022).

2.7.4.2 Anwendung der ECT bei tief sitzenden Tumoren

Derzeit konzentriert sich die Forschung darauf, die optimalen Behandlungsbedingungen und Richtlinien für die Therapie tief sitzender Tumoren zu ermitteln, einschließlich Primärtumoren wie lokal fortgeschrittene Pankreaskarzinome, STS und Ovarialkarzinome sowie nicht-kutane Metastasen wie Knochenmetastasen und insbesondere KRLM (CONDELLO et al., 2022; EDHEMOVIC et al., 2011; ŁAPIŃSKA et al., 2020; PROBST et al., 2018).

In einer präklinischen Studie konnte die Kombination von EP mit i.t. Gabe von BLM bei Hamstern eine Ansprechrate von 25% erzielen, ohne das Parenchym des Pankreas zu beeinträchtigen. Klinische Studien bestätigten zudem, dass die Anwendung von ECT bei lokal fortgeschrittenem Adenokarzinom des Pankreas eine sichere und effektive Behandlungsmodalität darstellt (PROBST et al., 2018).

Die ECT könnte auch die Behandlungsergebnisse bei STS verbessern, indem die Intensität des elektrischen Feldes an die spezifischen elektrischen Eigenschaften des Gewebes angepasst wird (PROBST et al., 2018).

In Kombination mit BLM und Hormontherapien wie 17 β -Östradiol zeigte ECT bei menschlichen Ovarialkarzinomzellen erhöhte Wirksamkeit (CONDELLO et al., 2022; ŁAPIŃSKA et al., 2020).

Präklinische Studien deuteten darauf hin, dass Knochenmetastasen durch ECT effektiv behandelt werden können, indem Krebszellen bei gleichzeitiger Erhaltung der Knochendichte angegriffen werden. Es wurde bei klinischen Studien eine Schmerzlinderung mit Verbesserung der Lebensqualität bei 56% der Patienten festgestellt. ECT ermöglichte eine schnellere Erholung, wobei 84% der Patienten eine Schmerzreduktion von mindestens 50% erfuhren (PROBST et al., 2018).

Die ECT erwies sich als hochwirksam bei der Reduktion des Volumens von KRLM. Die Behandlung führte zu nahezu vollständiger Nekrose des Tumorgewebes, die sowohl auf die direkte zytotoxische

Wirkung von BLM auf Tumorzellen als auch auf die indirekten Effekte auf die Tumorgefäße zurückzuführen ist. In klinischen Studien, histopathologische Analysen der KRLM nach ECT zeigten umfangreiche Nekrose und Fibrose in den Tumor- sowie benachbarten Normalgeweben, wobei eine Regeneration der betroffenen Areale drei Monate nach der Behandlung beobachtet wurde. Zudem ergab die Analyse, dass die Mehrheit der Gefäße mit einem Durchmesser von mehr als 5 mm sowie die biliären Strukturen nach der ECT erhalten blieben (PROBST et al., 2018).

2.8 Wahl der chemotherapeutischen Substanzen für diese Studie

Für diese Studie wurden drei unterschiedliche Therapieschemata verwendet. Alle Gruppen wurden mittels ECT behandelt, erhielten jedoch unterschiedliche i.v. chemotherapeutische Wirkstoffe. Die erste Gruppe erhielt BLM, die zweite OXP und die dritte eine Kombination aus OXP und BVZ.

2.8.1 BLM

BLM wurde aufgrund der Ergebnisse in früheren Studien ausgewählt, in denen es eine 1000-fach höhere Toxizität im Vergleich zu einer 80-fachen Steigerung bei Cisplatin aufwies (PROBST et al., 2018). In der ersten Phase unserer Studie erhöhte ECT die Wirksamkeit von BLM um etwa 400% (SPILOTIS et al., 2023). Darüber hinaus erwies sich diese Therapie als deutlich effektiver bei der Reduktion der Sauerstoffsättigung des Tumors (SO_2), der Senkung der Hämoglobinkonzentration des Tumors (HbT), der Verringerung der Tumovaskularisation sowie der Induktion von Tumornekrosen im Vergleich zur RE allein oder zur alleinigen Verabreichung von BLM ohne RE in einem Rattenmodell.

2.8.2 OXP

OXP, eines der neuesten Platinderivate, wurde in dieser Studie gezielt für die Behandlung KRLM gewählt, da es im Vergleich zu Cisplatin spezifische Vorteile aufweist, die für diese Tumorart von besonderer Bedeutung sind.

Ein entscheidender Unterschied liegt in der molekularen Struktur von OXP. Es besitzt eine Diaminocyclohexan (DACH)-Gruppe anstelle der Aminogruppen von Cisplatin (IBRAHIM et al., 2004). Diese Modifikation beeinflusst die Art der chemischen Reaktionen, die es nach dem Eintritt in die Zelle und dem Austausch von Chloridionen gegen Wassermoleküle eingeht, wodurch reaktive Platinverbindungen entstehen, insbesondere Dichloro-[DACH]-Platin-Komplexe. Diese dringen in den Zellkern ein und bilden primär Quervernetzungen mit Guanin in der DNA, wodurch DNA-Platin-Addukte entstehen (FAIVRE et al., 2003). Dies hemmt die Replikation und Transkription der DNA, was die antineoplastische Wirkung von OXP unterstreicht (GRAHAM et al., 2000).

OXP unterscheidet sich von Cisplatin nicht nur in seiner chemischen Struktur, sondern auch in seiner Wirkweise auf zellulärer Ebene. Während Cisplatin-induzierte DNA-Addukte die Fehlpaarungsreparatur (Mismatch Repair, MMR) aktivieren, was die Erkennung und Reparatur dieser DNA-Schäden erleichtert, löst OXP keine vergleichbare MMR-Aktivierung aus. Dies macht es insbesondere für Tumoren

mit MMR-Defizienz, wie dem häufig bei KRK vorkommenden Tumortyp, äußerst wirksam (AHMAD, 2010; CASSIDY, 2000). Diese Eigenschaft von OXP erklärt seine hohe Wirksamkeit beim mKRK, bei dem häufig genetische Veränderungen im MMR-System vorliegen.

Darüber hinaus induziert OXP die Apoptose über sowohl intrinsische als auch extrinsische Signalwege und fördert den immunogenen Zelltod, der für die Behandlung von mKRK von zentraler Bedeutung ist (ARANGO et al., 2004; GOURDIER et al., 2002; HAYWARD et al., 2004; TESNIERE et al., 2010).

2.8.3 BVZ

BVZ, ein humanisierter rekombinanter monoklonaler Antikörper, der spezifisch an alle Varianten von VEGF-A bindet und deren biologische Aktivität effektiv inhibiert, wurde in dieser Arbeit aufgrund seiner synergistischen Effekte in Kombination mit OXP-basierter Chemotherapie bei der Behandlung von mKRK gewählt (CHIBAUDEL et al., 2012; SALTZ et al., 2008). In klinischen Studien, insbesondere in Kombination mit FOLFOX, zeigte BVZ vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Ansprechraten von PFS sowie von OS. Diese Effekte hängen stark vom individuellen klinischen Kontext ab, zeigen jedoch in mehreren Studien eine weitgehend einheitliche Tendenz (GIANTONIO et al., 2023; SALTZ et al., 2008).

Ein wichtiger Mechanismus, durch den BVZ seine Wirkung entfaltet, ist die Hemmung des durch OXP induzierten Anstiegs von VEGF-A, der häufig zu einer Verstärkung der fenestrierten sinusoidalen Endothelzellen und zur Entwicklung einer hepatischen sinusoidalen Schädigung (Hepatic Sinusoidal Injury, HSI) führt (MAY et al., 2011). HSI, ein Zustand, der histopathologische Ähnlichkeiten mit dem sinusoidalen Obstruktionssyndrom (SOS) aufweist, führt zu endothelialen Mikrodissektionen und regionalen Obstruktionen (KOPETZ et al., 2009; MAY et al., 2011; OVERMAN et al., 2010; YOKOMORI et al., 2003). Diese OXP-assoziierte Toxizität kann sich durch eine Splenomegalie, erhöhten portalen Venendruck und eine persistierende Thrombozytopenie manifestieren, was das Risiko von Blutungen, insbesondere bei Patienten mit portaler Hypertension und geplanten Leberresektionen, erhöht (ALOIA et al., 2006; KANDUTSCH et al., 2008). Studien deuten darauf hin, dass die Zugabe von BVZ die Häufigkeit einer leichten bis moderaten Thrombozytopenie, die bei 5-FU- und OXP-basierten Therapien auftritt, deutlich verringern könnte (OVERMAN et al., 2018a).

2.9 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

In den letzten zwei Jahrzehnten haben sich EP-basierte Behandlungsmethoden rasant entwickelt, wobei die ECT als neuartige Therapieform zur Behandlung von Krebserkrankungen eingeführt wurde. Präklinische und klinische Studien haben vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Behandlung tiefsitzender Tumoren mit ECT berichtet. Infolgedessen wird erwartet, dass die Anwendung der ECT in der klinischen Praxis in den kommenden Jahren zunehmen wird. Aus diesem Grund sollte die Wirksamkeit und Sicherheit dieser Methode vor ihrer Anwendung zur Behandlung tiefsitzender Tumoren umfassend evaluiert werden.

Diese Studie zielt darauf ab, die spezifischen Effekte der genannten Medikamente auf verschiedene Parameter zu analysieren. Die Ergebnisse sollen Aufschluss darüber geben, ob die Kombinationstherapien sicher und effektiv sind und welche Nebenwirkungen möglicherweise zu berücksichtigen sind.

Ein weiteres Ziel der Studie besteht darin, das Medikament zu identifizieren, welches in Bezug auf die Tumoroxygenierung, Tumorperfusion, Tumorangiogenese, Induktion vom nekrotischen Tumorgewebe und Apoptose die besten Ergebnisse erzielt. Darüber hinaus wird analysiert, welches der untersuchten Pharmaka eine höhere Ansprechrate auf die ECT zeigt und somit das Potenzial für eine effektivere Kombinationstherapie bietet.

Zusätzlich soll die Studie Grundlagen für zukünftige Forschungsansätze schaffen, die kombinierte Therapieprotokolle mit ECT untersuchen, um potenzielle Vorteile der ECT in Verbindung mit verschiedenen chemotherapeutischen Substanzen weiter zu evaluieren. Darüber hinaus könnten die Ergebnisse dieser Dissertation wertvolle Hinweise für zukünftige klinische Studien sowie die Implementierung von ECT in die Routineversorgung liefern.

Mit dieser Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Unterschiede zeigen sich in den Wirkmechanismen von BLM, OXP und der Kombination aus OXP und BVZ in Bezug auf die Induktion von Nekrose und apoptotischem Zelltod, und welche Rückschlüsse lassen sich daraus hinsichtlich der Effektivität der Tumorzellbekämpfung ziehen? (*Bezug zu Kapitel 5.1*)
- Inwiefern lassen sich durch die Ultraschall- und photoakustische Bildgebung Unterschiede in der Tumoroxygenierung und -perfusion zwischen den Therapiegruppen nachweisen, und welches der untersuchten Regimes führt zu einer stärkeren Beeinträchtigung dieser Parameter? (*Bezug zu Kapitel 5.2*)
- Welche Auswirkungen hat die Hinzunahme von BVZ zur OXP-basierten ECT auf die Tumorangiogenese im Vergleich zur BLM- und OXP-Monotherapie, und welche therapeutischen Implikationen ergeben sich aus den beobachteten Unterschieden? (*Bezug zu Kapitel 5.3*)

Durch die Beantwortung dieser Fragestellungen wird nicht nur ein besseres Verständnis für die potenziellen Vorteile von BLM in der ECT-Therapie erlangt, sondern es wird auch ein Beitrag zur Entwicklung neuer, innovativer Therapieansätze geleistet, die möglicherweise eine Verbesserung der klinischen Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem KRK ermöglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Tiermodell und rechtliche Grundlage

Für die Experimente kommen insgesamt 24 Wistar Albino Glaxo Rijswijk (WAG/Rij) Ratten beider Geschlechter (12 männlich und 12 weiblich) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht (KG) von $239 \pm 5,6$ g und einem durchschnittlichen Alter von $46 \pm 1,9$ Wochen (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts, SEM) zum Einsatz (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, Deutschland). Die Tiere befinden sich in Gruppen von 2 bis maximal 3 Ratten pro Käfig (Makrolon-Käfige®) und werden in einer temperatur- und feuchtigkeitskontrollierten Umgebung bei Temperaturen von 20 bis 24°C und Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 10\%$ gehalten. Die Lichtzyklen sind im 12-Stunden-Rhythmus zwischen Hell und Dunkel geregelt. Den Tieren steht uneingeschränkter Zugang zu Wasser und standardisiertem Labortierfutter (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) sowie zu Holzgranulat als Einstreu und Nestmaterial zur Verfügung. Vor Beginn der Experimente akklimatisieren sich die Ratten eine Woche lang und werden während des gesamten Versuchszeitraums täglich von geschultem Personal betreut und überwacht.

Die Experimente erfolgen in Übereinstimmung mit den Richtlinien des europäischen Tierschutzgesetzes (European legislation on the protection of animals, Directive 2010/63/EU) sowie den ethischen Grundsätzen für Tierversuche (National Institutes of Health, NIH) (CLARK et al., 1997). Zudem liegt eine Genehmigung des Landesamt für Verbraucherschutz in Saarbrücken, Deutschland, vor (Berechtigungsnummer: 21/2019).

3.2 Hygienemanagement und Schutzmaßnahmen bei der Haltung spezifiziert pathogenfreier (SPF) Ratten

Die im Experiment verwendeten Ratten stammen aus spezifiziert pathogenfreien (SPF) Zuchtlinien. Diese Tiere sind frei von unerwünschten Keimen und besitzen eine physiologische Darmflora, wobei nicht aufgeführte Keime entweder nicht vorhanden, nicht nachweisbar oder nicht untersucht sind. Um eine Kontamination zu verhindern, befinden sich die Tiere in einer streng kontrollierten Umgebung, in denen die Luft gefiltert und sowohl Käfige als auch Einstreu autoklaviert werden. Auch das Futter unterliegt speziellen Behandlungen, um den hygienischen Standard aufrechtzuerhalten.

Das Tierhaltungssystem folgt technischen und hygienischen Barrieren, die den Kontakt zu potenziell schädlichen Keimen verhindern. Harmlosere Keime, die keine Gefahr für die Tiere darstellen, werden toleriert, wodurch die Ratten eine deutlich höhere Lebenserwartung aufweisen. Der Zugang zur Tierhaltung ist nur nach entsprechender Einweisung durch Fachpersonal gestattet, wobei strikte Hygienevorschriften eingehalten werden müssen. Dazu gehört das Wechseln der Kleidung sowie das Tragen von Schutzkleidung, einschließlich Überschuhen, Kitteln, Hauben, Mundschutz und Handschuhen.

Ein Wechsel zwischen verschiedenen Tierhaltungen oder Räumen mit unterschiedlichem Hygienestatus findet nicht statt, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden. Auffälligkeiten, wie kranke Tiere oder technische Defekte, werden unverzüglich gemeldet. Personen mit schweren respiratorischen Erkrankungen oder Durchfallerkrankungen dürfen die Tierhaltungen nicht betreten, um die Tiere nicht zu gefährden.

3.3 Kennzeichnung der Käfige und Tiere in den Experimenten

Die Käfige und Versuchstiere werden präzise gekennzeichnet, um eine eindeutige Zuordnung und Identifikation sicherzustellen. Jeder Käfig ist mit einer standardisierten Käfigkarte versehen, auf der wesentliche Informationen wie Spezies, Stamm, Herkunft, Alter und Geschlecht der Tiere vermerkt sind. Zusätzlich erhält die Karte die Versuchsbezeichnung und eventuelle Eingriffe, sodass alle relevanten Details zum Experiment auf einen Blick verfügbar sind.

Die Tiere selbst werden durch eine permanente Ohrmarkierung eindeutig identifiziert. In Käfigen mit maximal drei Ratten blieb das erste Tier unmarkiert, während das zweite Tier ein Loch in einem Ohr erhält. Das dritte Tier wird mit einem Loch in beiden Ohren versehen. Diese einfache, aber effektive Methode gewährleistet eine unverwechselbare Identifikation jedes Tieres im Rahmen des Versuchsablaufs.

3.4 Experimentelles Protokoll und Ablauf

Die Tiere werden in drei Gruppen ($n_1=8$, $n_2=8$, $n_3=8$) randomisiert und verteilt. Jede Gruppe besteht aus vier männlichen und vier weiblichen Versuchstieren. Am Tag 0 erfolgt eine Laparotomie, bei der Kolonkarzinomzellen in den linken Leberlappen (Lobus hepatis sinister) implantiert werden. Am 8. Tag unterziehen sich alle Gruppen einer Relaparotomie, bei der die neu entstandenen Tumore mittels Ultraschall und photoakustischer Bildgebung analysiert werden. Anschließend erhält jede Gruppe ein unterschiedliches Behandlungsschema.

Alle Gruppen werden mit einer i.v. Chemotherapie in Kombination mit RE (ECT) behandelt. Die erste Gruppe erhält BLM i.v., die zweite OXP i.v. und die dritte eine Kombination aus OXP mit BVZ i.v. (siehe Abb. 3.4.1). Die Verabreichung der Chemotherapie erfolgt über die Vena cava inferior.

Vor Beginn der Behandlung erfolgt bei jeder Gruppe eine Ultraschalluntersuchung, um den Ausgangszustand der Tiere zu bestimmen. Am fünften Tag nach der Behandlung (Tag 13) unterziehen sich die Versuchstiere einer Relaparotomie, bei der eine abschließende Ultraschall- und photoakustischen Bildgebung der Tumoren sowie die Entnahme venöser Blutproben durchgeführt werden. Zur detaillierten Untersuchung des Lebergewebes werden Gewebeproben des linken Leberlappens entnommen und anschließend histologisch sowie immunhistochemisch analysiert (siehe Abb. 3.4.2).

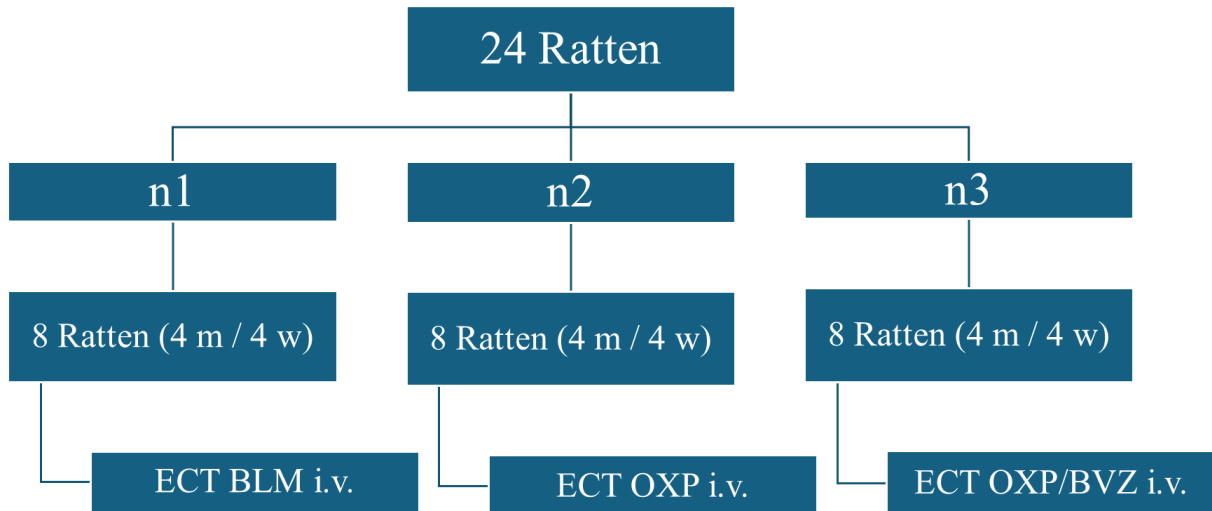


Abb. 3.4.1: Gruppenverteilung und Therapieschemata.

Zur Überwachung möglicher Gewichtsveränderungen aufgrund der Behandlung wird das KG der Tiere an den Tagen 0, 8 und 13 vor den Interventionen gemessen. Ein Gewichtsverlust von mehr als 20% des Ausgangsgewichts dient als Abbruchkriterium für die Studie. Zur postoperativen Schmerzlinderung erhalten die Tiere Tramadolhydrochlorid (40mg pro 100ml Trinkwasser; Tramal® 100mg/ml; Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) in regelmäßigen Abständen. Die Wundheilung und der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere werden kontinuierlich überwacht.

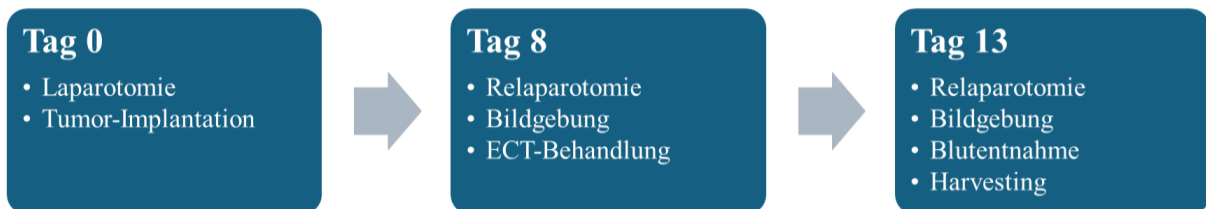


Abb. 3.4.2: Ablauf des Versuchsprotokolls.

3.5 Tumorzell-Implantation im Tiermodell

Die Isofluran-Anästhesie (Isofluran 1 ml/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland) wird mit einer initialen Konzentration von 2 bis 3% eingeleitet und während des Eingriffs bei einer Konzentration von 0,25 bis 2% aufrechterhalten, um eine stabile und kontrollierte Narkose zu gewährleisten. Der Gasfluss erfolgt über einen Verdampfer (Dräger Vapor 19.3 für Forane/Forene, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland) in Kombination mit einem Sauerstoffkonzentrator 1025KS / 10L (Drive DeVilbiss Healthcare, Isny im Allgäu, Deutschland). Zusätzlich kommt das Fluovac-System, IMS Fluosorber (Veterinary Fluosorber, Harvard Apparatus, Cambridge, Massachusetts, USA) zum Einsatz, das eine spezielle Doppelschutzmaske integriert, die das Narkosemittel zuführt und

gleichzeitig überschüssige Dämpfe absaugt. Dieses System absorbiert die Anästhesiegase aus dem Arbeitsbereich und schützt das Personal vor einer potenziellen Exposition. Das Fluovac-System ist direkt mit dem Verdampfer verbunden, wodurch es zur Sicherheit während der Anästhesiedurchführung und des gesamten Eingriffs beiträgt (siehe Abb. 3.5.1).

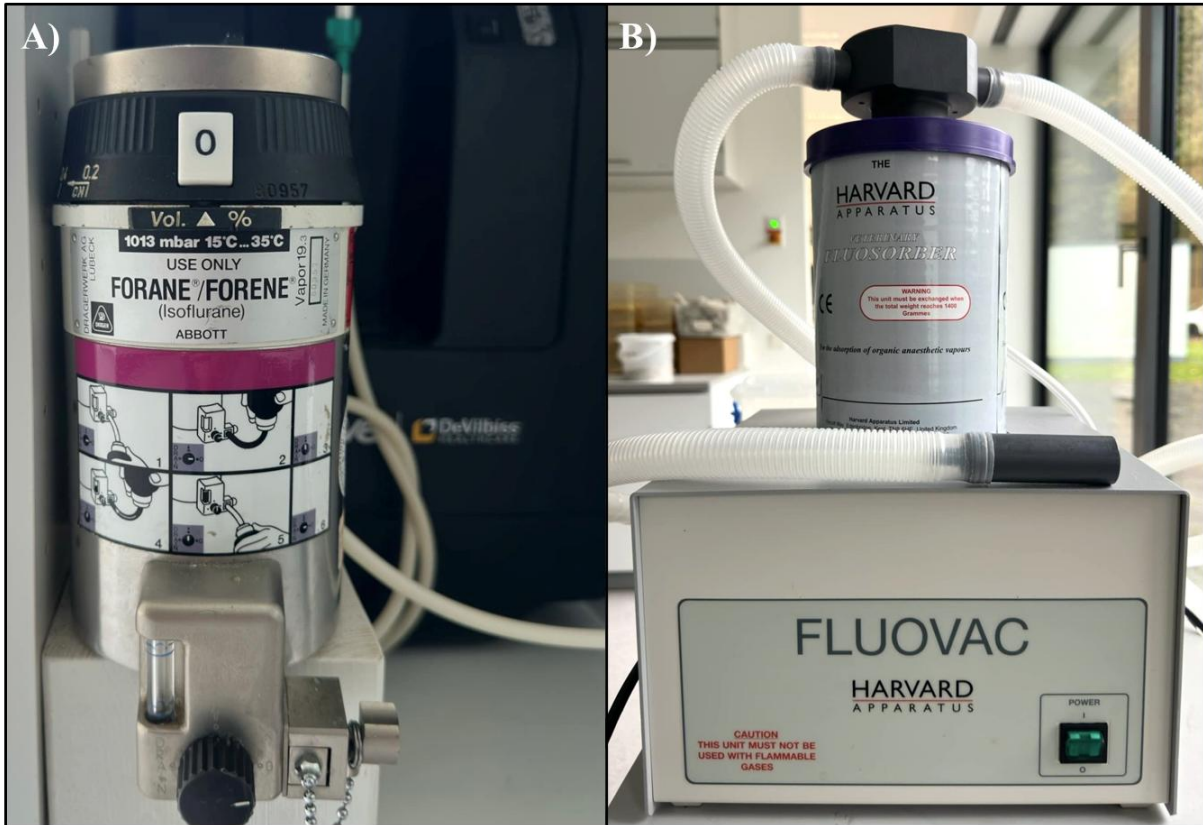


Abb. 3.5.1: Narkose- und Absorptionssysteme zur Tieranästhesie

A) Dräger Vapor 19.3 für Forane/Forene (Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland) und Sauerstoffkonzentrator 1025KS / 10L (Drive DeVilbiss Healthcare, Isny im Allgäu, Deutschland). **B)** Fluovac-System (IMS Fluosorber, Veterinary Fluosorber, Harvard Apparatus, Cambridge, Massachusetts, USA).

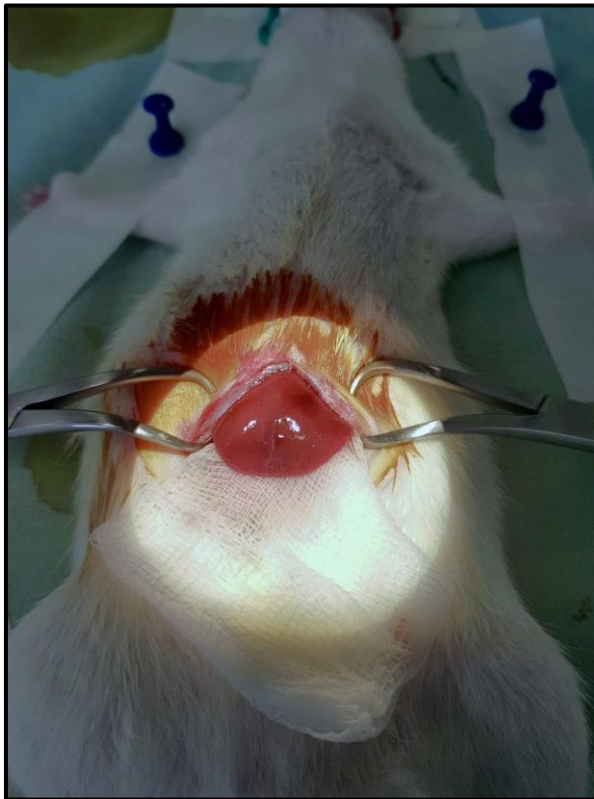
Nach der Narkoseeinleitung werden die Ratten am Bauch rasiert und das KG wird dokumentiert. Anschließend erhalten die Tiere 0,05 mg / Kilogramm KG (kgKG) Buprenorphin subkutan (s.c.) (Temgesic® 0,3 mg/ml; Indivior Europe Limited, Dublin, Irland) zur Schmerzprophylaxe. Die Injektion wird flach in die seitliche Bauchwand durchgeführt, wobei die s.c. Lage der Nadel sorgfältig überprüft wird.

Die Tumorzellen sind gemäß zuvor veröffentlichten Studien kultiviert (KAUFFELS et al., 2019). Zur Induktion von KRLM erfolgt die Positionierung der Tiere in Rückenlage auf einer elektronisch geregelten Heizmatte, welche die Körpertemperatur konstant bei 37°C hält. Unter kontinuierlicher Isofluranarkose wird eine mediane Laparotomie mit einem Skalpell (Skalpellklingen Figur 11 aus Karbonstahl, Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Der Zugang zum Bauchraum wird mithilfe steriler Tuchklemmen nach Backhaus offen gehalten, um eine optimale Sicht und

Zugänglichkeit zu gewährleisten. Anschließend wird die Leber vorsichtig mobilisiert, um eine exakte Positionierung zu ermöglichen und den Lobus hepatis sinister freizulegen.

In die subkapsuläre Region des linken Leberlappens werden präzise 5×10^5 CC531-Zellen, suspendiert in 50 μL phosphatpufferter Kochsalzlösung, mithilfe einer 30G \times 1/2" Nadel (Omnican® F, B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) appliziert. Zur Blutstillung und Vermeidung des Austritts der Tumorzellen wird unmittelbar nach der Injektion ein steriles Wattestäbchen (FIWA®app, Fink u. Walter GmbH, Merchweiler, Deutschland) auf die Einstichstelle gedrückt (siehe Abb. 3.5.2).

A)



B)

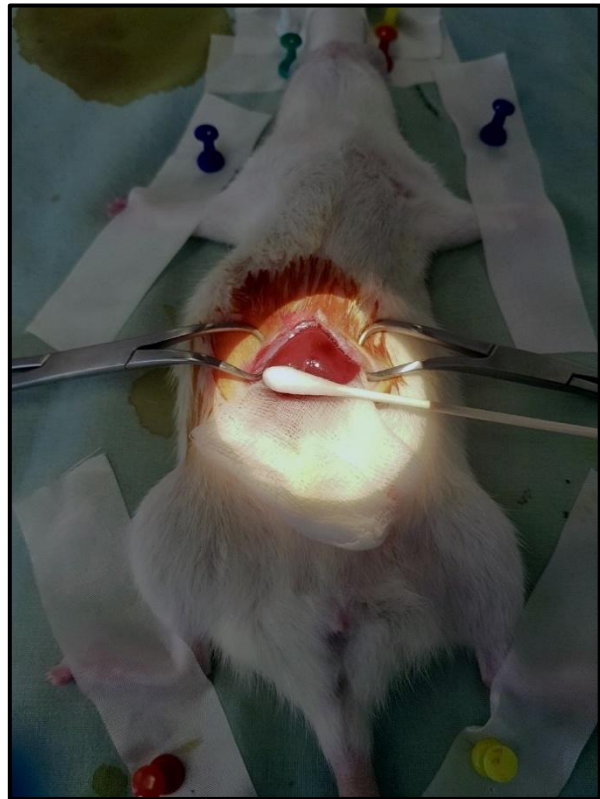


Abb. 3.5.2: WAG/Rij Ratte (Tag 0) während Implantation der Tumorzellen.

Nach der Zellapplikation wird die Leber sorgfältig in ihre anatomische Position in der Bauchhöhle zurückgebracht. Zunächst erfolgt der Verschluss der abdominalen Faszie mit einer zweiläufigen, kontinuierlichen Naht unter Verwendung von Vicryl 4-0 (Ethicon LLC, Johnson & Johnson INTERNATIONAL, Diegem, Belgien), um die Stabilität der Bauchdecke zu gewährleisten. Anschließend wird die Haut ebenfalls mit einer zweiläufigen, kontinuierlichen Nahttechnik verschlossen, um eine komplikationslose Wundheilung zu fördern (siehe Abb. 3.5.3).

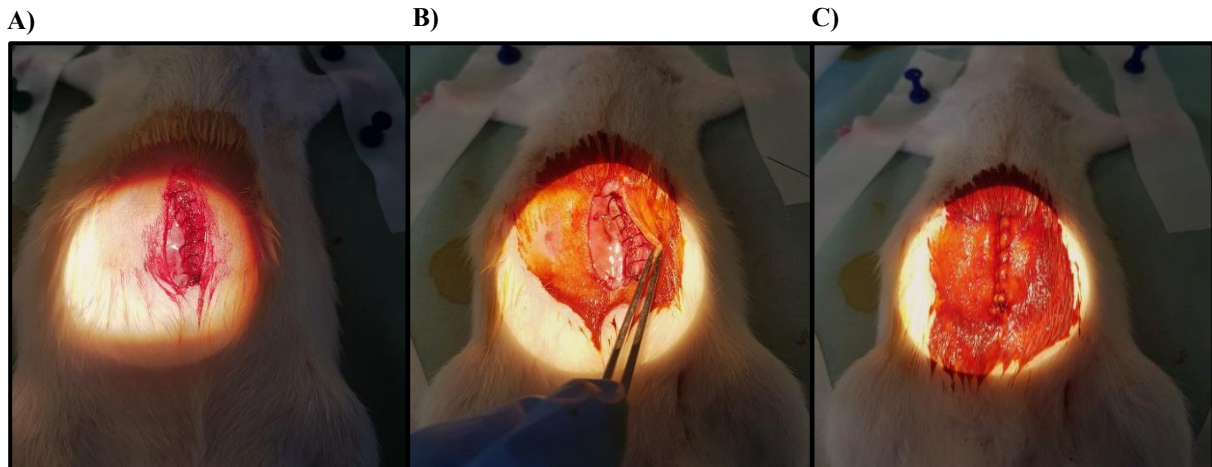


Abb. 3.5.3: Verschluss der abdominalen Faszie und der Haut.

A) und B) Faszienverschluss mit Vicryl 4-0, Haut offen. **C)** Kompletter Wundverschluss, einschließlich Haut, mit Vicryl 4-0 (Ethicon LLC, Johnson & Johnson INTERNATIONAL, Diegem, Belgien).

3.6 Durchführung der ECT

Am Tag 8 erfolgt die ECT unter denselben vorbereitenden Maßnahmen wie bei der Tumorumplantation. Die Tiere werden unter Isofluran-Inhalationsanästhesie (2-3% Einleitung, 0,25-2% Aufrechterhaltung) sediert. Nach der Anästhesie werden die Tiere am Bauch rasiert, gewogen und mit 0,05 mg/kg Buprenorphin s.c. zur Schmerzprophylaxe behandelt. Vor der Intervention wird eine Ultraschalluntersuchung durchgeführt, um das Tumolvolumen, die Tumoroxygenierung und die Tumorperfusion zu dokumentieren. Anschließend werden die Tiere in Rückenlage auf einer elektronisch geregelten Heizmatte fixiert, die ihre Körpertemperatur konstant bei 36 bis 37°C hält, um thermische Stabilität zu gewährleisten.

Bei allen drei Gruppen erfolgt die Verabreichung der chemotherapeutischen Wirkstoffe i.v. als Bolusinjektion mit einer 30G×1/2" Nadel (BD Microlance™ 3, Becton Dickinson GmbH, Drogheda, Irland) gemäß zuvor veröffentlichten Standards (MIZOBE et al., 2008; PESTIEAU et al., 2001; SPERLING et al., 2012). Die erste Gruppe erhält BLM (BLEO-cell® 15 mg, STADAPHARM GmbH) in einer Dosis von 4 Einheiten pro kgKG (U/kgKG), die zweite Gruppe erhält OXP (Oxaliplatin STADA® 5 mg/ml, STADAPHARM GmbH) mit einer Dosierung von 5 mg/kgKG (mg/kgKG), und die dritte Gruppe erhält OXP in Kombination mit BVZ (Oyavas® 25 mg/ml, STADAPHARM GmbH) in einer Dosierung von 5 mg/kgKG.

Nach Entfernung der Punktionsnadel wird die Blutung an der Einstichstelle des Gefäßes durch anhaltenden Druck des intakten Peritoneums sowie vorsichtigen zusätzlichen Druck mittels eines Wattestäbchens gestillt. Anschließend erfolgt die Mobilisation der Leber und die Freilegung des linken Leberlappens, um das Einsetzen der Elektroden zu erleichtern. Der kugelförmige Tumor weist einen

Durchmesser von 0,5 bis 1,0 cm auf und zeigt sowohl symmetrische als auch asymmetrische Läsionen. Zur Durchführung der EP werden zwei parallele Nadelelektroden verwendet, die einen Abstand von 8 mm, eine Länge von 20 mm und einen Durchmesser von 2,36 mm aufweisen. Diese Elektroden sind in einem Kunststoffhalter fixiert und mit einem elektrischen Impulsgenerator (Sennex® Tumor Therapie System, BIONMED® Technologies GmbH, Saarbrücken, Germany) verbunden (siehe Abb. 3.6.1).

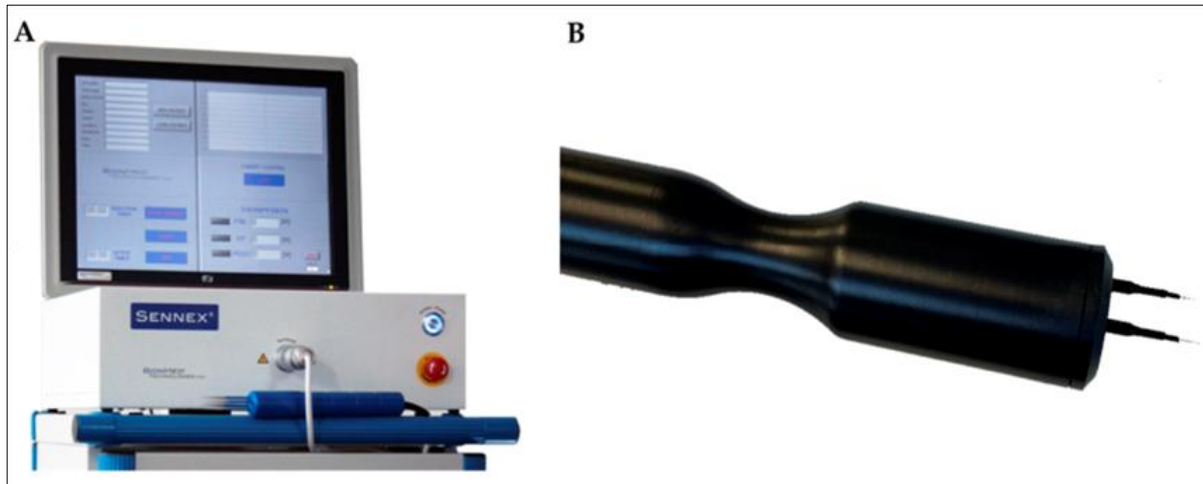


Abb. 3.6.1: SENNEX® Tumor Therapie System.

A) Elektrischer Impulsgenerator (Sennex® Tumor System, BIONMED® Technologies GmbH, Saarbrücken, Deutschland). **B)** Zwei parallele minimal invasive Nadelelektroden (Abstand 8 mm, Länge 20 mm und Durchmesser 2,36 mm), die in einem Kunststoffhalter fixiert sind und mit dem elektrischen Impulsgenerator verbunden. (Mit freundlicher Genehmigung von BIONMED® GmbH).

Die Elektroden werden vorsichtig senkrecht zur Peripherie der Leber in einer Tiefe von 0,5 cm um den äußeren Rand des Tumors eingeführt, um eine ausreichende Abdeckung des elektrischen Feldes für die ECT zu gewährleisten. Drei Minuten nach Applikation der Chemotherapie erfolgen acht elektrische Impulse mit einer Dauer von 100 μ s zwischen den beiden Elektroden erzeugt (SERSA et al., 2002). Die Spannung zwischen dem Elektrodenpaar ist auf 1000 V eingestellt, was einer Amplitude von 1000 V/cm und einer Frequenz von 1 Hz entspricht (GEHL et al., 2018; MARTY et al., 2006). Nach der Impulsabgabe werden die Elektroden aus dem Leberparenchym entfernt, und die Hämostase erfolgt mittels Mullkompressen (Askina® Mullkompressen 10×10 cm, B. Braun Melsungen AG, Deutschland).

Der elektrische Impulsgenerator überwacht kontinuierlich die Impulsabgabe und liefert Feedback über das Ergebnis. Dies ist von entscheidender Bedeutung, um sicherzustellen, dass die Behandlung erfolgreich ist und keine unvollständige Therapie aufgrund falscher Elektrodenposition oder Gewebeeigenschaften erfolgt.

Nach Abschluss der Behandlung wird die Leber wieder in ihre anatomische Position in der Bauchhöhle zurückgebracht. Der Verschluss der Laparotomie erfolgt wie zuvor durch präzises Nähen der Faszie und der Haut mit Vicryl 4-0 Nahtmaterial, um eine optimale Wundheilung zu gewährleisten.

3.7 Ultraschall und photoakustische Bildgebung

Die photoakustische Bildgebungstechnologie bietet eine innovative Methode zur Gewinnung von Informationen über das Gewebe. Kurze Impulse (~5 bis 50 ns) elektromagnetischer Strahlung werden in das Gewebe gesendet und selektiv von bestimmten Gewebestandteilen wie Hämoglobin (Hb), Melanin und Wasser absorbiert, die als natürliche Kontrastmittel (KM) für die photoakustische Bildgebung dienen (RICH und SESHADRI, 2015). Durch die optische Absorption entsteht eine thermoelastische Reaktion, die wiederum Ultraschallwellen erzeugt werden kann. Diese Ultraschallwellen werden mithilfe eines Schallkopfes erfasst und in ein Bild umgewandelt (MALLIDI et al., 2015; RICH und SESHADRI, 2015). Besonders das Signal von Hb ist für die photoakustische Bildgebung von großer Bedeutung, da es eine Beurteilung der O₂-Versorgung und Durchblutung des Gewebes ermöglicht, insbesondere bei Tumoren. Dies spielt eine wesentliche Rolle bei der Erfassung von Tumorphoxie sowie bei der Überwachung der Tumoroxygenierung und -perfusion nach der Behandlung. Die Wahl der Wellenlänge (λ) der elektromagnetischen Strahlung ist entscheidend, da die Absorptionskoeffizienten der Chromophore stark davon abhängen. Durch die gezielte Auswahl der λ lassen sich spezifische Informationen über das Gewebe gewinnen.

Die Ultraschalluntersuchung erfolgt an den Tagen 8 und 13 direkt auf der Leberoberfläche durchgeführt. Vor Beginn der Ultraschalluntersuchung werden die Tiere unter Isofluran-Inhalationsanästhesie (2-3% Einleitung, 0,25-2% Aufrechterhaltung) sediert. Nach der Narkose werden sie am Bauch rasiert, gewogen und mit 0,05 mg/kg Buprenorphin s.c. zur Schmerzprophylaxe versorgt. Um die Körpertemperatur stabil bei 36 bis 37°C zu halten, werden die Tiere in Rückenlage auf einer elektronisch geregelten Heizmatte fixiert.

Nach der Präparation der Leber und Freilegung des Tumors werden die Tiere in das Vevo LAZR-System (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, ON, Kanada) überführt. Dort werden sie auf einer beheizten Plattform positioniert, um eine stabile Lagerung und konstante Untersuchungsbedingungen zu gewährleisten. Die Aufrechterhaltung der Isofluran-Narkose erfolgt durch das Vevo Anesthesia System (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, ON, Kanada), ein in sich geschlossenes Isofluran-basiertes Anästhesiesystem, das entweder mit Drucksauerstoff oder medizinischer Luft arbeitet und sich problemlos in die Handhabungsplattform der Ratten integriert (siehe Abb. 3.7.1).

Die Körpertemperatur bleibt während der gesamten Untersuchung zwischen 36 und 37°C gehalten (THM150; Indus Instruments, Houston, TX, USA), um physiologische Bedingungen zu simulieren. Herz- und Atemfrequenz werden kontinuierlich überwacht, um die Narkosesicherheit der Tiere zu gewährleisten. Zur optimalen Übertragung des Ultraschallsignals und zur Minimierung von Artefakten wird ein farbloses, wässriges und auf Körpertemperatur erwärmtes Ultraschallgel ohne Luftblasen (Aquasonic 100, Parker Laboratories, Inc., New Jersey, USA) direkt auf die Tumoroberfläche appliziert (siehe Abb. 3.7.2). Die Untersuchung erfolgt unter sterilen Bedingungen, um das Risiko einer

Kontamination des Tumorgewebes zu minimieren. Nach Abschluss der Untersuchung werden die Tiere aus der Narkose geweckt und in ihre Käfige zurückgebracht, wo sie unter Beobachtung stehen, bis sie sich vollständig erholen.



Abb. 3.7.1: Vevo Anesthesia System (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, ON, Kanada).

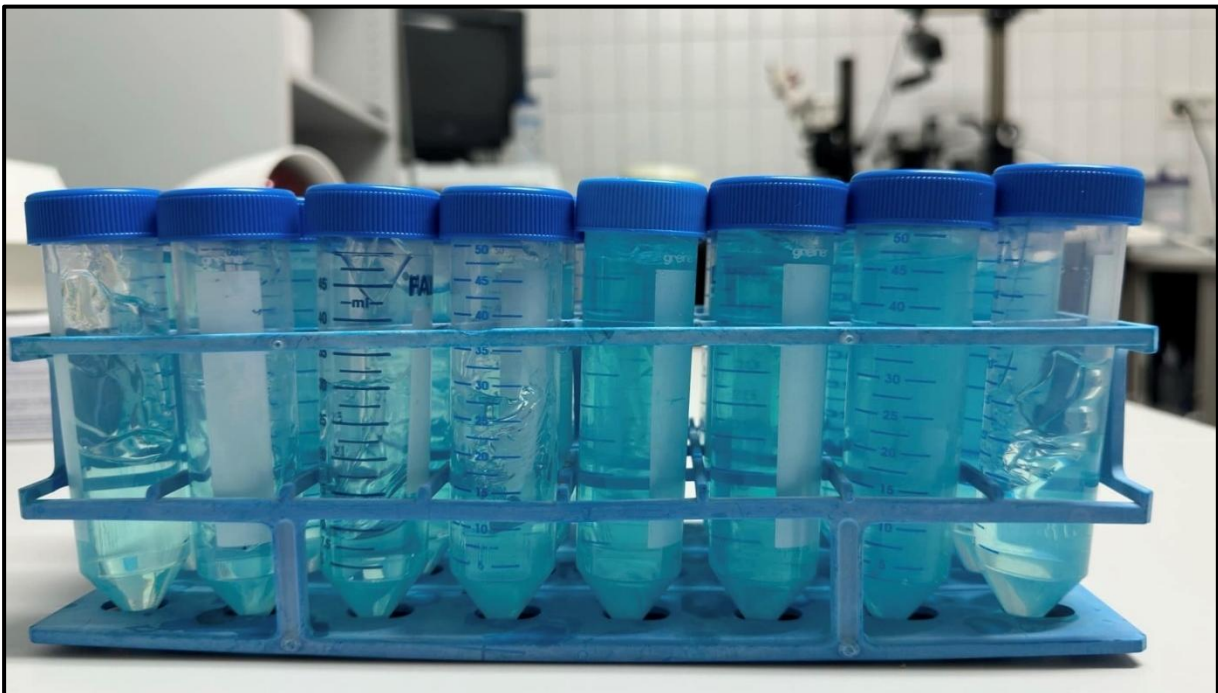


Abb. 3.7.2: Ultraschallgel ohne Luftblasen (Aquasonic 100, Parker Laboratories, Inc., New Jersey, USA).

Für die Ultraschall- und photoakustische Bildgebung kommen das Vevo LAZR-System (FUJIFILM Visual Sonics Inc., Toronto, ON, Kanada) sowie ein LZ550 real-time microvisualisation linear-array-Schallkopf (FUJIFILM VisualSonics Inc.) mit einer Zentralfrequenz von 40 MHz zum Einsatz. Der 40-MHz-Schallkopf ist an einen Schrittmotor angeschlossen, der den Schallkopf automatisch über die Oberfläche des linken Leberlappens bewegt (siehe Abb. 3.7.3).

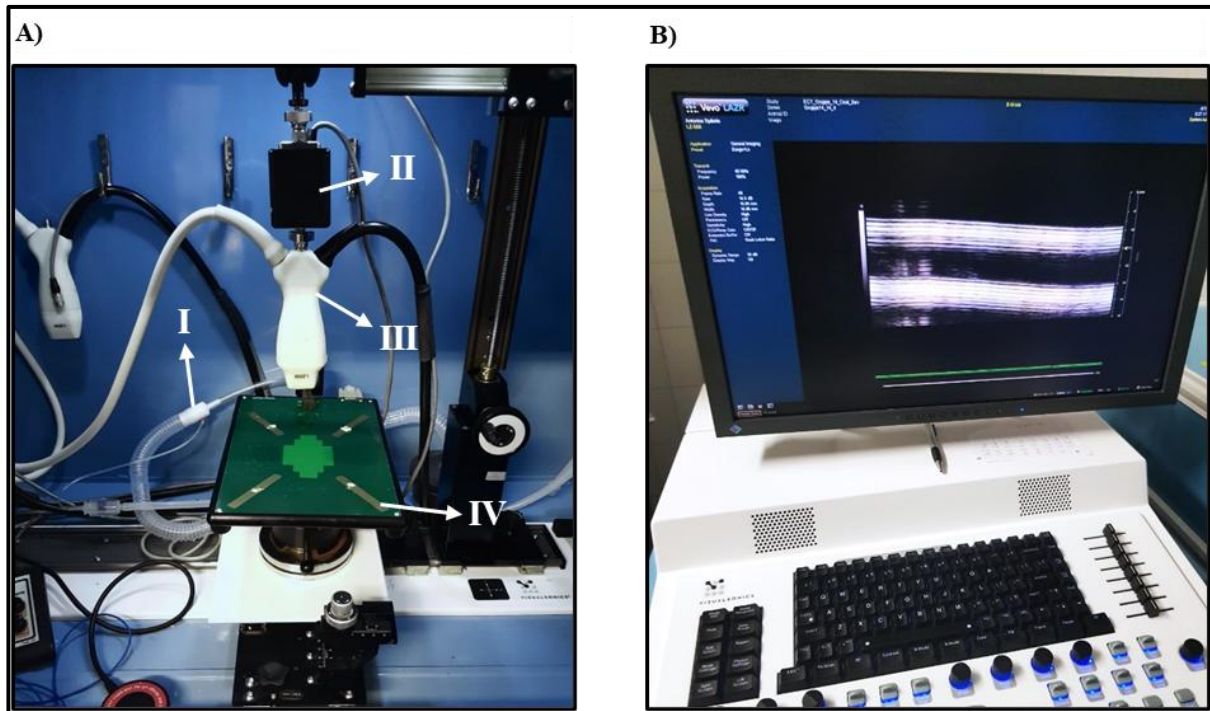


Abb. 3.7.3: Vevo LAZR-System (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, ON, Kanada).

A) Untersuchungsplatz für die Ultraschall- und photoakustische Bildgebung, inklusive (I) Schlauch zur Gaszufuhr der Isofluran-Anästhesie, verbunden mit dem Vevo Anesthesia System, (II) Schrittmotor, (III) 40-MHz-LZ550-Schallkopf und (IV) temperaturgesteuerter Plattform zur Fixierung der Tiere während der Anästhesie. **B)** Monitor zur Anzeige der Ultraschallbilder des Vevo LAZR-Systems.

Die Ultraschallbilder entstehen durch parallele zweidimensionale Aufnahmen in gleichmäßig verteilten Abständen von 300 μm . Zur dreidimensionalen Rekonstruktion des Tumors werden die Tumordimensionen von den Untersuchern auf jedem zweidimensionalen Bild manuell markiert. Mithilfe dieser Daten generiert die integrierte Software des Vevo LAZR-Systems ein polygonales dreidimensionales Modell des Tumors und berechnet dessen Volumen.

Im OxyHemo-Modus werden photoakustische Bilder bei zwei λ (750 nm und 850 nm) mit einer zweidimensionalen photoakustischen Verstärkung von 42 dB und einem Hb-Schwellenwert von 20 dB aufgenommen. Die Untersuchung erfolgt bei 750 nm und 850 nm, um aus den Signalen des oxygenierten und deoxygenierten Hbs den Sauerstoffpartialdruck (pO_2) zu bestimmen (NEEDLES et al., 2013). Die Auswahl dieser λ zielt darauf ab, die potenziellen Auswirkungen von Ödemen, die durch die ECT-Behandlung auf das photoakustische Signal entstenden, zu minimieren, da Wasser bei diesen beiden λ

nur eine geringe Absorption aufweist (MALLIDI et al., 2015). SO₂ und HbT werden im gesamten Tumorgewebe berechnet, um wichtige Informationen über den O₂-Gehalt und die Durchblutung des Tumors zu liefern.

Die Ultraschallbilder werden von drei erfahrenen Forschern mit umfangreicher Expertise in der Leber-Ultraschallbildgebung konsensuell analysiert. Während der Auswertung sind die Forscher nicht über die Gruppenzugehörigkeit der Ratten informiert, um eine höhere Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

3.8 Auswertung und statistische Verfahren

3.8.1 Histopathologische Untersuchung

Nach der Resektion des linken Leberlappens am Tag 13 wird der Tumor zusammen mit dem angrenzenden normalen Lebergewebe längs in zwei Hälften geteilt. Die erste Hälfte des Tumors wird unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren, wobei der flüssige Stickstoff aus einem Flüssigstickstoff-Kryobehälter (TP100, Air Liquide S.A., Paris, Frankreich) entnommen wird (siehe Abb. 3.8.1.1). Die



Abb. 3.8.1.1: Flüssigstickstoff-Kryobehälter (TP100, Air Liquide S.A., Paris, Frankreich)

zweite Hälfte wird in einer 4%igen phosphatgepufferten Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die gefrorenen Proben werden bis zu den Analysen bei -80°C gelagert.

Die Gewebeschnitte werden kodiert und unabhängig voneinander mikroskopisch untersucht, wobei eine Verblindung hinsichtlich der Behandlungsgruppe besteht. Alle histologischen und immunhistochemischen Analysen erfolgen mithilfe einer Olympus DP73 Kamera, die mit einem Olympus BX53-Mikroskop (Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japan) verbunden ist (siehe Abb. 3.8.1.2). Zur Bildaufnahme und -bearbeitung kommt die Bildgebungssoftware cellSens Dimension 1.15 (Olympus) zum Einsatz.

Zur Beurteilung des nekrotischen Tumorgewebes werden die formalinfixierten Gewebeproben und die in Paraffin eingebetteten Proben in 3- μ m-Schnitte geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die nekrotischen Bereiche des Tumorgewebes lassen sich als Prozentsatz der gesamten Tumorfläche quantifiziert. Die HE-Färbung

ermöglicht eine klare Unterscheidung zwischen nekrotischem und gesundem Gewebe, was eine präzise Beurteilung der Tumorstruktur erlaubt.



Abb. 3.8.1.2: Olympus BX53-Mikroskop mit Olympus DP73 Kamera (Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japan).

3.8.2 Immunhistochemische Analyse

Die histologische und immunhistochemische Untersuchungen erfolgen unabhängig voneinander. Durch den Einsatz verschiedener Fixierungs- und Färbemethoden lassen sich unterschiedliche Aspekte des Tumorgewebes detailliert untersuchen und miteinander vergleichen. Die Gewebeobjektträger werden entparaffiniert, und Proteindemaskierung erfolgt mit Citratpuffer (pH 6). Endogene Peroxidasen werden mit 3% Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Methanol blockiert, während unspezifische Bindungen durch eine Blockierung mit 3% Ziegen-Serum verhindert werden. Die immunhistochemischen Analysen werden in 10 zufällig ausgewählten Hauptgesichtsfeldern (High-Power-Field, HPF) von nicht-nekrotischem Tumorgewebe durchgeführt. Dabei ermöglichen spezifische Antikörper den Nachweis bestimmter Proteine im Tumorgewebe. Die Ergebnisse werden anhand der Proteinexpression in verschiedenen Bereichen des Tumors, sowohl im Zentrum als auch in der Peripherie, miteinander verglichen (5 HPF im Zentrum und 5 HPF in der Peripherie des Tumors).

Die Zellproliferation des Tumorgewebes wird mittels des proliferierenden Zellkernantigens (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) analysiert. Zwei μm dicke Schnitte der in Paraffin eingebetteten Proben werden für 18 Stunden bei $4^\circ C$ mit einem monoklonalen Maus-Anti-Human-PCNA-Antikörper (Verdünnung 1:100; Dako, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Zur Detektion des PCNA dient ein Peroxidase-konjugierter Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörper (Verdünnung 1:100; Dianova), der für 30

Minuten inkubiert wird, gefolgt von der Anwendung von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen und Hämalaun zur Gegenfärbung. Die PCNA-positive Zellpopulation wird im Verhältnis zur Gesamtzahl der Tumorzellen in 10 HPF von nicht-nekrotischem Tumorgewebe erfasst, um einen Proliferationsindex zu erstellen. Dieser Index ermöglicht die Einteilung der Proben in fünf Kategorien: 0 ($\leq 1\%$ PCNA-positive Zellen), 1 (1-10% PCNA-positive Zellen), 2 (10-30% PCNA-positive Zellen), 3 (30-50% PCNA-positive Zellen) und 4 ($\geq 50\%$ PCNA-positive Zellen).

Zur Beurteilung des apoptotischen Zelltodes wird die gespaltene Caspase-3, eine Cystein-Aspartat-Protease, als Indikator verwendet. Zwei μm dicke Schnitte der paraffin-eingebetteten Leberproben werden über Nacht bei Raumtemperatur mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen die gespaltene Caspase-3 (Verdünnung: 1:100, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) inkubiert. Dieser Antikörper erkennt das große Fragment (17/19 kDa) der aktivierten Caspase-3, jedoch nicht die vollständige Länge der Caspase-3. Für die Streptavidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Färbung kommt ein biotinylierter Anti-Kaninchen-Ig-Antikörper als Sekundärantikörper (ready-to-use, Abcam, Cambridge, UK) zum Einsatz. Anschließend erfolgt eine Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalaun. Die Anzahl der positiv gefärbten Zellen wird in jeder Probe in 10 HPF von nicht-nekrotischem Tumorgewebe erfasst und als absolute Anzahl positiver Zellen pro HPF angegeben.

Das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten wird durch eine Immunfärbung mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Myeloperoxidase (MPO)-Antikörper (Verdünnung: 1:100; Abcam, Cambridge, UK) als primärer Antikörper nachgewiesen. Nach der Inkubation mit einem biotinylierten Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (ready-to-use; Abcam, Cambridge, UK) wird 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) (Abcam, Cambridge, UK) als Chromogen verwendet und die Schnitte wurden mit Mayers'-Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) kontrastiert. Die positiv gefärbten Zellen werden in 10 HPF von nicht-nekrotischem Tumorgewebe gezählt und als absolute Zellzahl pro HPF angegeben.

Die vaskuläre Versorgung des Tumors wird anhand der Expression des Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekuls (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, PECAM-1; Cluster of Differentiation 31, CD31) untersucht. Hierfür wird ein primärer polyklonaler Kaninchen-CD31-Antikörper (Verdünnung: 1:200; Abcam, Cambridge, UK) verwendet. Die Detektion erfolgt mit einem biotinylierten Anti-Kaninchen-Ig-Antikörper (ready-to-use; Abcam, Cambridge, UK), der eine Kreuzreaktion ermöglicht. Die Anzahl der PECAM-1-positiven Blutgefäße wird in 10 HPF von nicht-nekrotischem Tumorgewebe erfasst und die Mikrogefäßdichte in mm^{-2} angegeben.

3.8.3 Serologische Untersuchungen

Am 13 Versuchstag erfolgt unmittelbar nach dem Abschluss der Ultraschalluntersuchung die Entnahme venöser Blutproben durch Punktion der subhepatischen Vena cava, um umfassende hämatologische Analysen durchzuführen. Die gewonnenen Blutproben werden anschließend in einem vollautomatischen Hämatologiesystem (Abaxis VetScan HM5, Scil Animal Care Company GmbH, Viernheim,

Deutschland) analysiert, das speziell für die präzise Bestimmung hämatologischer Parameter entwickelt ist (siehe Abb. 3.8.3.1). Die Blutentnahme erfolgt mit einer Probengröße von 0,025 ml, die für Rattenproben im Rahmen der 3-fach-Differenzierung geeignet ist.



Abb. 3.8.3.1: Abaxis VetScan HM5, Scil Animal Care Company GmbH, Viernheim, Deutschland.

Das VetScan HM5 stellt ein fortschrittliches hämatologisches Analysesystem dar, das auf der Impedanzmethode basiert. Dabei wird die Blutprobe durch einen elektrischen Strom geleitet, wobei die Blutzellen durch die entstehenden minimalen Unterbrechungen des Stromflusses als elektrische Impulse erfasst werden. Diese Impulse ermöglichen die Differenzierung der Zellen nach Größe und Volumen. Das System erlaube somit eine präzise Unterscheidung zwischen verschiedenen Zelltypen, einschließlich Leukozyten ($10^9/L$), Lymphozyten ($10^9/L$), Monozyten ($10^9/L$), neutrophile Granulozyten ($10^9/L$), Erythrozyten ($10^{12}/L$) und Thrombozyten ($10^9/L$). Neben der Zellzahl ermittelt das System auch weitere relevante hämatologische Parameter, wie die Hb-Konzentration (g/dL) und den Hämatokrit (HKT, %). Die exakte Quantifizierung dieser Zelltypen ermöglicht eine umfassende und präzise Einschätzung des hämatologischen Status der Versuchstiere, was für die anschließende Analyse und Interpretation der experimentellen Befunde von entscheidender Bedeutung ist.

3.8.4 Statistische Auswertung und Datenanalyse

Für die statistische Analyse wird das Softwareprogramm SigmaStat (IBM-SPSS, version 28.0.1.0, Inc., Chicago, USA) verwendet. Alle gemessenen Werte werden als Mittelwert \pm SEM der Stichprobe angegeben, um die Genauigkeit der Schätzung zu berücksichtigen.

Um die Ergebnisse der Ultraschall- und photoakustischen Bildgebung vor und nach der Behandlung zu vergleichen, wird eine statistische Analyse gepaarter Stichproben mittels Student's T-Tests durchgeführt. Ziel ist die Bewertung von Veränderungen des Tumolvolumens, der SO_2 und der gesamten HbT innerhalb der drei Gruppen vor und nach der Behandlung. Statistisch signifikante Ergebnisse werden mittels eines zweiseitigen Signifikanztests auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ bestimmt, um jede Abweichung von der Nullhypothese zu erfassen, unabhängig von der Richtung der Veränderung.

Um festzustellen, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der drei Gruppen bestehen, wird eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) durchgeführt. Diese Analyse umfasst die Ergebnisse aus der Bildgebung, der Histologie, der Immunhistochemie und der Blutuntersuchung. Vorab wird geprüft, ob die Daten normal verteilt sind und homogene Varianzen aufweisen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Nach dem Nachweis signifikanter Unterschiede in der einseitigen ANOVA erfolgt eine Post-hoc-Analyse, um die spezifischen Differenzen zwischen den Gruppen zu identifizieren. Hierbei wird die Bonferroni-Korrektur angewendet, um das Risiko von Typ-1-Fehlern durch multiple Vergleiche zu minimieren und die Interpretation der Ergebnisse zu sichern.

Zur Bewertung der Proliferation von Tumorzellen (PCNA) werden aufgrund der nominalen Skalierung der Daten Kreuztabellen und der Chi-Quadrat-Test herangezogen. Die zweiseitige asymptotische Signifikanz des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson wird mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Tumorentwicklung und allgemeiner Gesundheitszustand der Tiere

Am 8. Tag nach der Injektion der Tumorzellen entwickelten alle Tiere einen hepatischen Tumor im linken Leberlappen mit einem mittleren Durchmesser von 5 mm. Das Tumolvolumen vor der Behandlung betrug in der ersten Gruppe $32,97 \pm 3,62 \text{ mm}^3$, in der zweiten Gruppe $30,49 \pm 2,49 \text{ mm}^3$ und in der dritten Gruppe $35,83 \pm 3,18 \text{ mm}^3$ (Mittelwert \pm SEM). Das durchschnittliche Tumolvolumen über alle Gruppen hinweg lag bei $33,10 \pm 3,10 \text{ mm}^3$. Bei der statistischen Analyse mittels ANOVA wurden keine signifikanten Unterschiede im Tumolvolumen zwischen den drei Gruppen vor der Behandlung festgestellt ($p = 0,745$).

Am 13. Tag, als das Tumorwachstum weiter fortschritt, erschwerten die Bildung von Tumorödemen und die strukturellen Veränderungen im Tumorgewebe die präzise Messung des Tumolvolumens. Diese Veränderungen sind typisch bei der Tumorprogression und beeinflussten die Genauigkeit der volumetrischen Daten zu diesem Zeitpunkt. Während der Untersuchung und Behandlung der Tiere gab es keinen Hinweis auf das Vorhandensein von peritonealen oder extrahepatischen Metastasen, was darauf hinweist, dass die Tumorentwicklung auf den linken Leberlappen beschränkt blieb.

Zusätzlich zur Tumorüberwachung wurde das KG der Tiere als Indikator für ihren allgemeinen Gesundheitszustand herangezogen. Es zeigte sich ein geringfügiger, jedoch statistisch nicht signifikanter Rückgang des KGs von Tag 0 bis Tag 13, der weniger als 10% des gesamten KGs ausmachte. Trotz der bestehenden malignen Erkrankung behielten die Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum normale systemische Funktionen bei. Dies zeigte sich durch typische Aktivitätsmuster, regelmäßige Nahrungsaufnahme und normale Reinigungsgewohnheiten, was auf ein insgesamt stabiles Wohlbefinden hinweist.

4.2 Ultraschall und photoakustische Bildgebung

4.2.1 SO₂- und HbT-Werte vor der Intervention

Am 8. Tag wurden Ultraschall- und photoakustische Untersuchungen durchgeführt, um die bildgebenden Eigenschaften der Tumore vor der Behandlung zu bewerten. Zu diesem Zeitpunkt ergaben sich für die SO₂- und HbT-Werte ähnliche Ergebnisse in allen drei Gruppen, ohne statistisch signifikante Unterschiede.

Die SO₂-Werte vor der Behandlung lagen in der ersten Gruppe $80,10 \pm 1,87\%$, in der zweiten Gruppe $78,95 \pm 1,37\%$ und in der dritten $76,39 \pm 2,4\%$. Der durchschnittliche SO₂-Wert über alle Gruppen hinweg betrug $78,48 \pm 1,11\%$ (siehe Abb. 4.2.1.1 und Abb. 4.2.2.3)

Bei der Durchführung der ANOVA wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den SO₂-Werten zwischen den drei Gruppen vor der Behandlung beobachtet ($p = 0,394$).

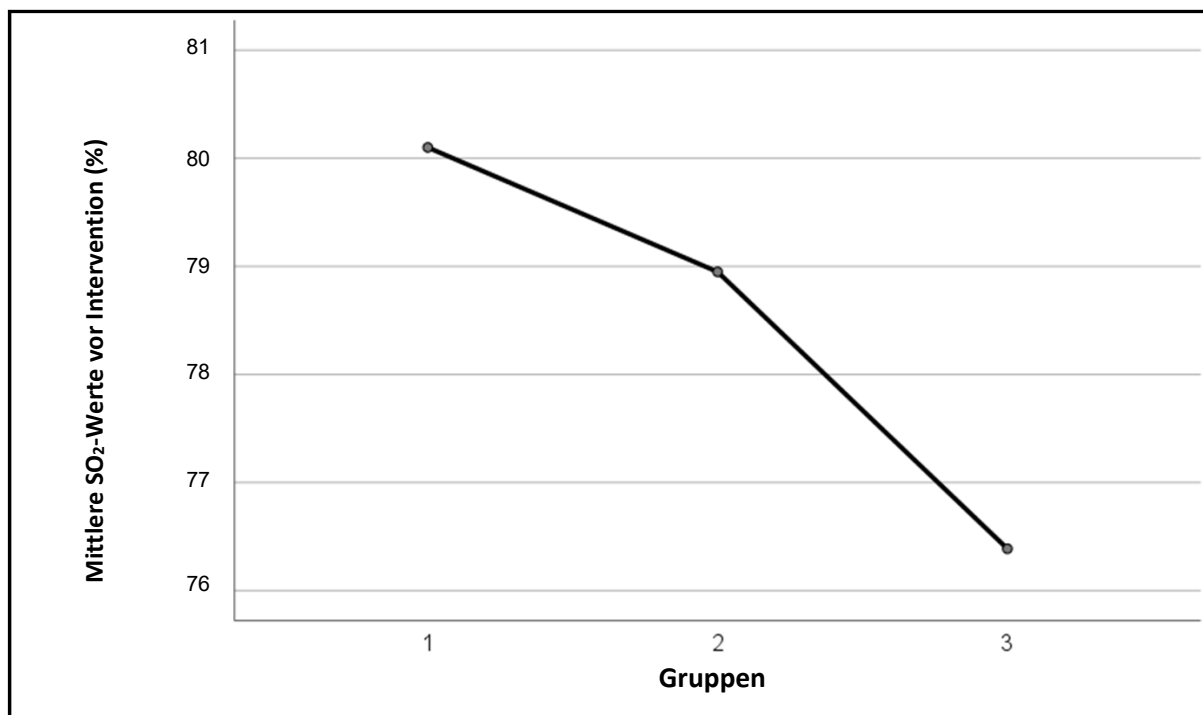


Abb. 4.2.1.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren SO₂-Werte vor der Behandlung. (Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ)

Die HbT-Werte vor der Behandlung waren ebenfalls ähnlich. In der ersten Gruppe betragen sie $3,111 \times 10^6 \pm 2,78 \times 10^6$ in der zweiten Gruppe $3,110 \times 10^6 \pm 1,23 \times 10^6$ und in der dritten Gruppe $3,100 \times 10^6 \pm 2,21 \times 10^6$. Der durchschnittliche HbT-Wert über alle Gruppen hinweg lag bei $3,107 \times 10^6 \pm 1,20 \times 10^6$. Der p-Wert zwischen den drei Gruppen betrug 0,999, was darauf

hindeutet, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den HbT-Werten vor der Behandlung vorlagen (siehe Abb. 4.2.1.2 und Abb. 4.2.2.3).

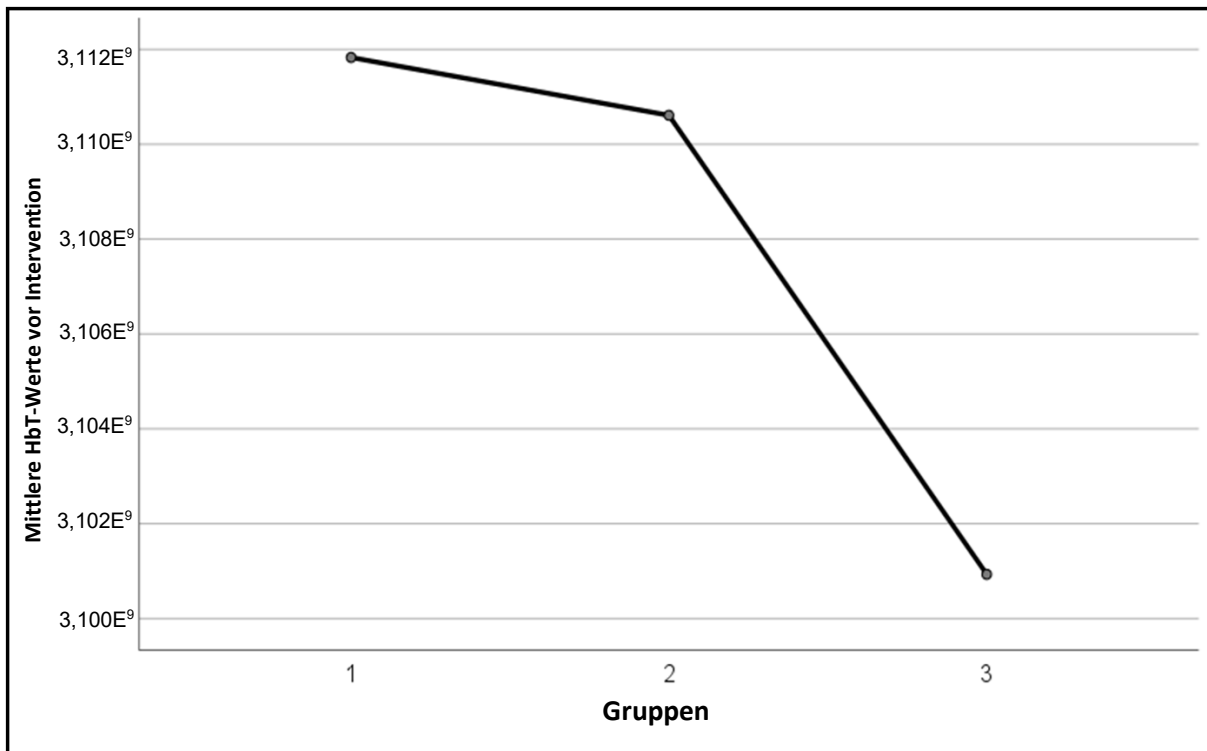


Abb. 4.2.1.2: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren HbT-Werte vor der Behandlung. (Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ)

4.2.2 SO₂- und HbT-Werte nach der Intervention

Am 13. Tag, fünf Tage nach der ECT, wurden die SO₂- und HbT- Werte erneut untersucht. Mithilfe des Student's T-Tests für gepaarte Stichproben wurden die SO₂- und HbT-Werte vor und nach der Behandlung für jede Gruppe individuell verglichen.

In der behandelten Region der BLM-Gruppe wurde eine Reduktion der SO₂ um 33,7% festgestellt (SO₂ vor der Behandlung: $80,1 \pm 1,8\%$; SO₂ nach der Behandlung: $46,4 \pm 4,8\%$). Die OXP/BVZ-Gruppe zeigte ebenfalls eine verminderte SO₂ des Tumors mit einem Rückgang um 12,1% (SO₂ vor der Behandlung: $76,4 \pm 2,4\%$; SO₂ nach der Behandlung: $64,3 \pm 2,5\%$). Im Gegensatz dazu verzeichnete die OXP-Gruppe einen moderaten Rückgang von 4,7% der SO₂-Werte (SO₂ vor der Behandlung: $79 \pm 1,4\%$; SO₂ nach der Behandlung: $74,3 \pm 1,5\%$) (siehe Abb. 4.2.2.3).

Trotz des geringeren Rückgangs der SO₂-Werte in der OXP-Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen zeigte der T-Test für gepaarte Stichproben in allen drei Gruppen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den SO₂-Werten vor und nach der Behandlung. Die p-Werte lagen in der zweiten und dritten Gruppe bei unter 0,001 und in der ersten Gruppe bei 0,01 (siehe Abb. 4.2.2.1 und Abb. 4.2.2.3).

Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte statistisch signifikante Unterschiede in den SO₂-Werten nach der Behandlung ($p < 0,001$), woraufhin mehrere Post-hoc-Tests durchgeführt wurden, um die genauen Gruppenunterschiede zu ermitteln. Die SO₂-Werte der BLM-Gruppe waren signifikant niedriger als in den beiden anderen Gruppen ($p < 0,01$). Auch zwischen der OXP- und OXP/BVZ-Gruppe wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ($p < 0,05$) (siehe Abb. 4.2.2.1).

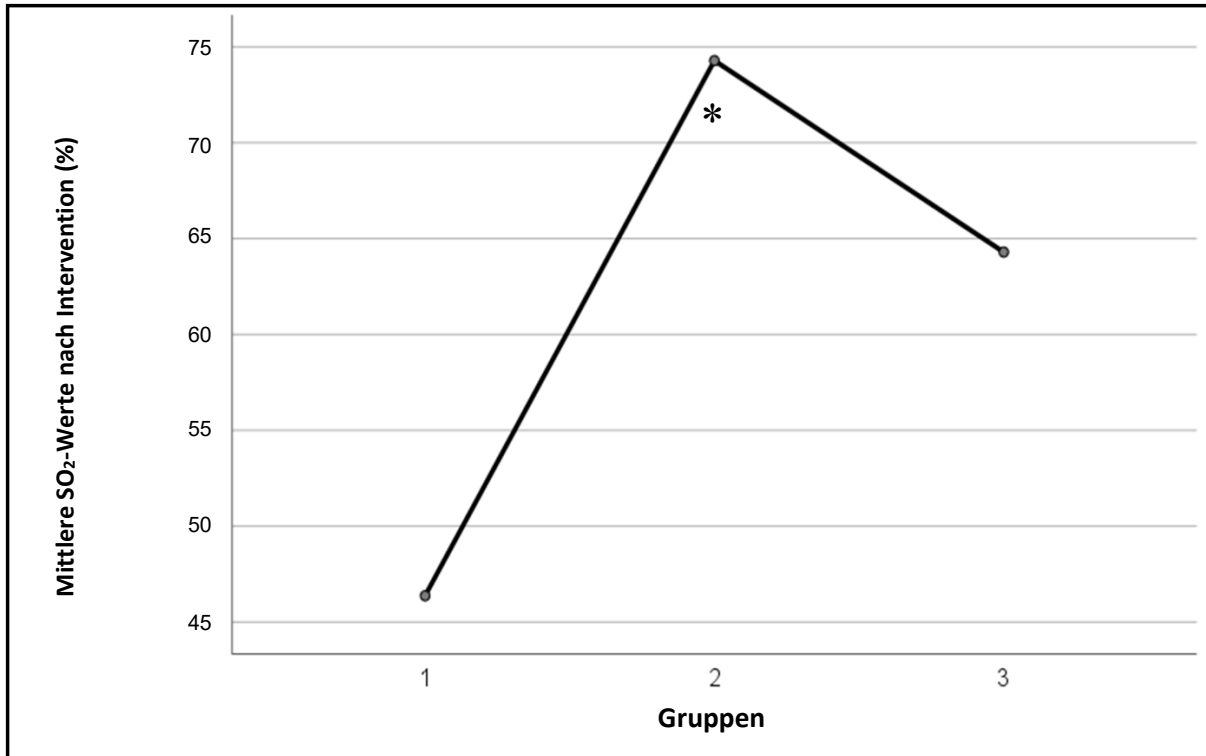


Abb. 4.2.2.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren SO₂-Werte nach der Behandlung. (Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ)

* $p < 0,05$ beim Vergleich der OXP-Gruppe jeweils mit der BLM- und der OXP/BVZ-Gruppe nach der Behandlung.

Die BLM-Gruppe wies die niedrigsten HbT-Werte im behandelten Gewebe nach der Intervention auf, mit Werten von $2,715 \times 10^6 \pm 2,49 \times 10^6$, was einem Rückgang von etwa 12,7% entspricht. Im Vergleich dazu lagen die HbT-Werte in der OXP-Gruppe bei $3,045 \times 10^6 \pm 1,33 \times 10^6$ und in der OXP/BVZ-Gruppe bei $2,996 \cdot 10^6 \pm 1,89 \cdot 10^6$, was Reduktionen von etwa 2,1% bzw. 3,4% darstellt. Diese Unterschiede führten jedoch nach der einfaktoriellen ANOVA und den Post-hoc-Tests nicht zu einer statistisch signifikanten Veränderung (siehe Abb. 4.2.2.2).

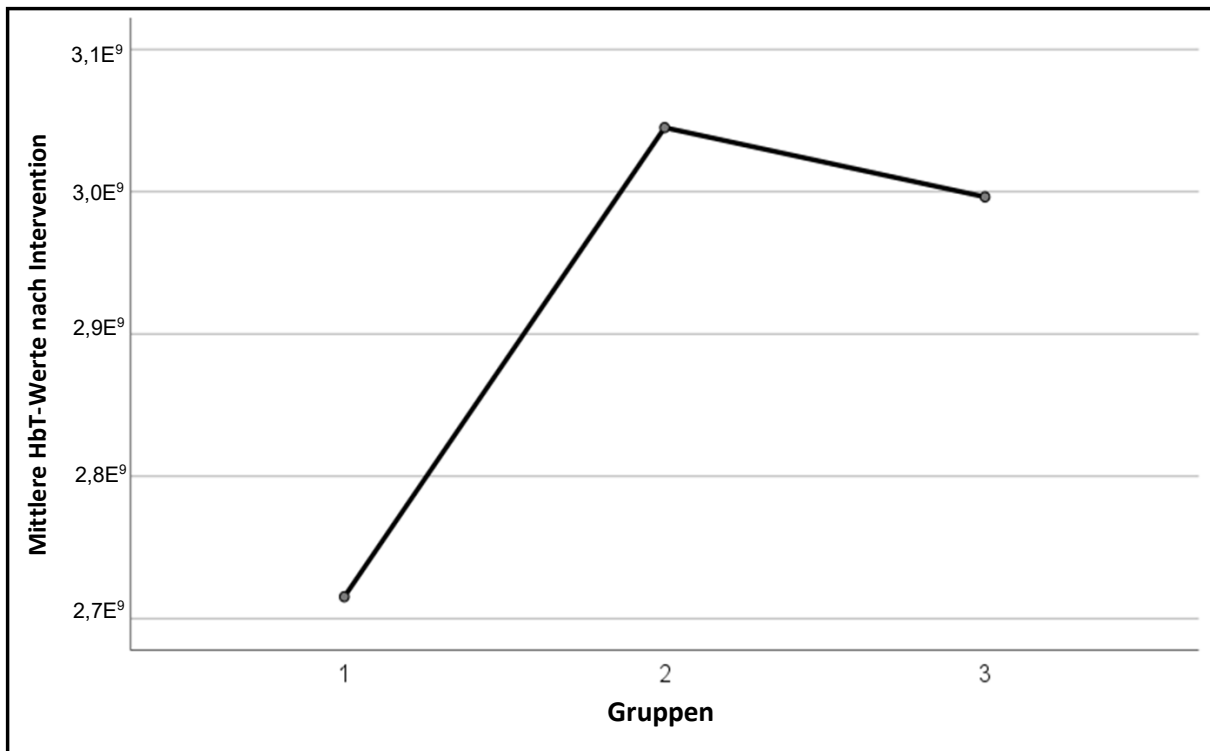


Abb. 4.2.2.2: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren HbT-Werte nach der Behandlung. (Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ)

Bei der Durchführung des T-Tests für gepaarte Stichproben wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen den HbT-Werten vor und nach der Behandlung sowohl in der BLM-Gruppe ($p < 0,01$) als auch in der OXP/BVZ-Gruppe ($p = 0,028$) beobachtet (siehe Abb. 4.2.2.3). In der OXP-Gruppe hingegen wurde keine signifikante Veränderung festgestellt. Bezüglich der HbT-Werte nach der Behandlung zeigten die Analysen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

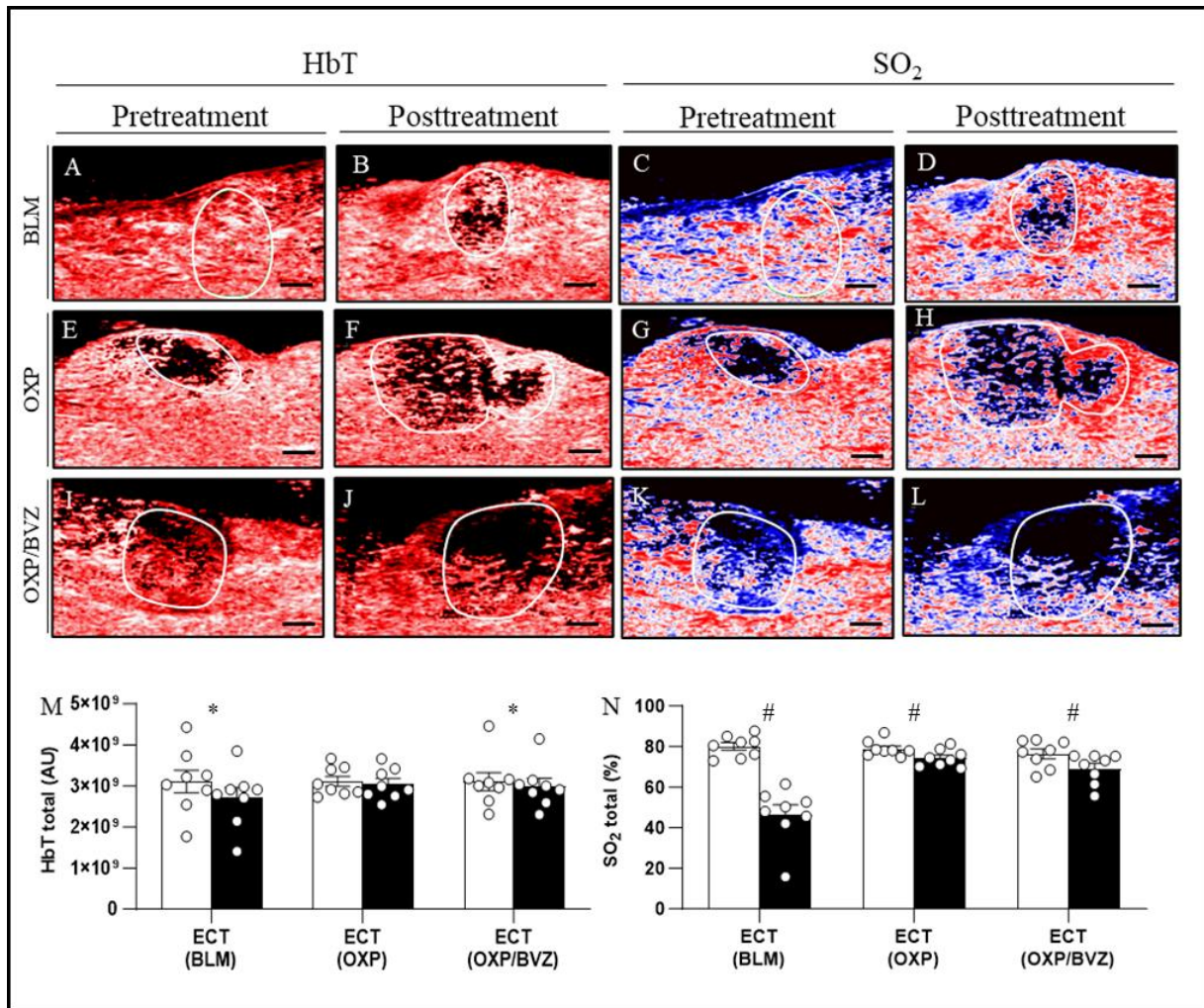


Abb. 4.2.2.3: HbT- und SO₂-Mapping mit Box-Plots der photoakustischen Bildgebung.

A-L) Photoakustische Bildgebung vor der Behandlung (Tag 8) und nach der Behandlung (Tag 13) mit HbT- sowie SO₂-Mapping bei Tieren, die mit ECT behandelt wurden und i.v. Verabreichung von BLM (**A-D**), OXP (**E-H**) oder OXP/BVZ (**I-L**) erhielten. In den SO₂-Maps zeigt Dunkelblau die niedrigsten Sättigungen, während Rot die höchsten Werte dargestellt sind. Weiße Linien markieren die Tumorumrisse. Maßstabsbalken: 1 mm. **M-N)** Box-Plot-Darstellungen der HbT- und SO₂-Werte, gemessen im gesamten Tumorbereich. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM angegeben; * $p < 0,05$ beim Vergleich der HbT-Werte vor und nach der Behandlung in der BLM- und OXP/BVZ-Gruppe; # $p < 0,05$ beim Vergleich der SO₂-Werte vor und nach der Behandlung in allen drei Gruppen.

4.3 Nekrose des Tumorgewebes

Die makroskopische Untersuchung zeigte eine klare Abgrenzung zwischen den mit ECT behandelten Arealen und dem normalen Leberparenchym, gekennzeichnet durch ovale oder unregelmäßige Formen. Die histologische Analyse von den HE-gefärbten Schnitten offenbarten, dass die Tumoren in allen drei Gruppen ähnliche mikroskopische Charakteristika aufwiesen. Am Rand des behandelten Bereichs wurden residuale Tumorzellen und eine Infiltration von Entzündungszellen nachgewiesen. Zudem zeigte sich eine Nekrose innerhalb der behandelten Bereiche, umgeben von einer fibrösen Zone. Diese fibrotische Pseudokapsel bestand aus fibroblastischem Gewebe, entzündlichen Zellen (einschließlich schaumiger Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen, Eosinophilen und Histozyten) sowie proliferierenden Kapillaren mit extravasierten Erythrozyten. Die Pseudokapsel wurde von regenerierenden marginalen Hepatozyten und gesundem Lebergewebe begrenzt, ohne Tumordinfiltration. Die Wände der Blutgefäße und Gallengänge, angrenzend an die Ablationszone, blieben in allen Gruppen intakt.

Die histologische Analyse in der BLM-Gruppe ergab einen Tumorgewebeanteil von $18,80 \pm 1,70 \text{ mm}^2$. In der OXP-Gruppe betrug der Tumorgewebeanteil $17,53 \pm 3,73 \text{ mm}^2$, während in der OXP/BVZ-Gruppe ein Tumorgewebeanteil von $13,82 \pm 2,97 \text{ mm}^2$ festgestellt wurde (siehe Abb. 4.3.1).

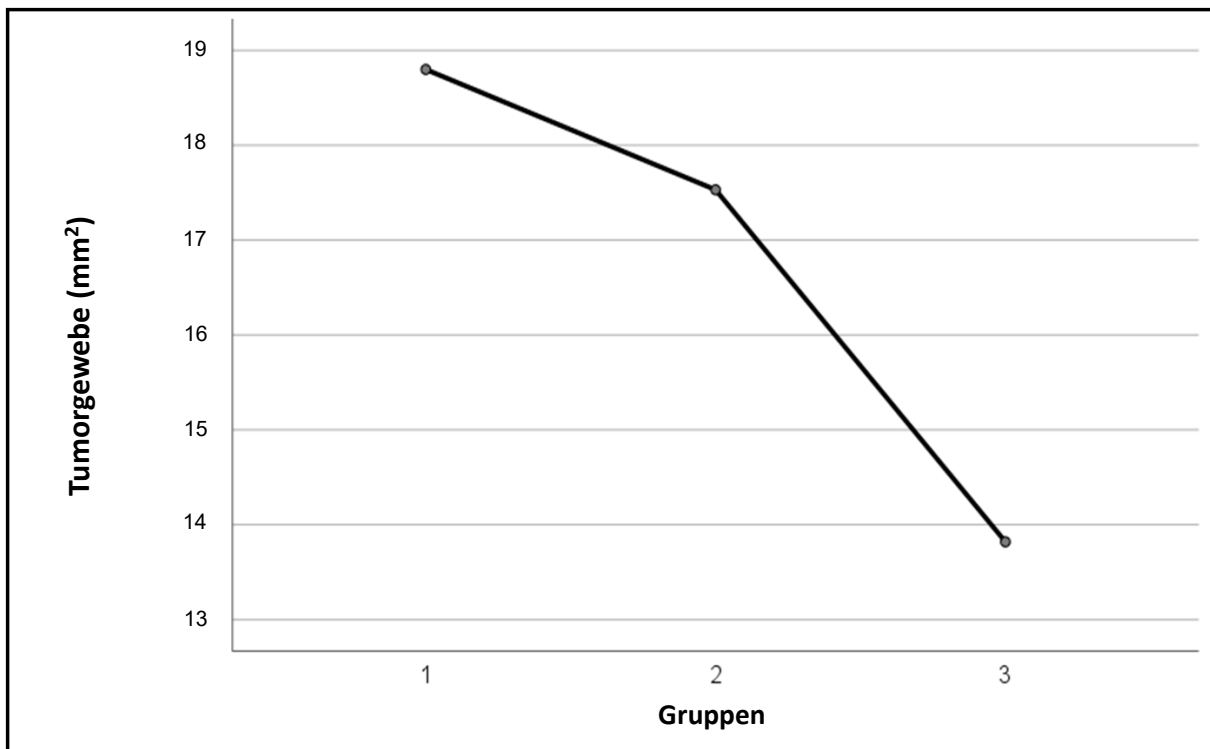


Abb. 4.3.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Werte des Tumorgewebes nach der Behandlung.
(Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ)

Von dem Tumorgewebe in der BLM-Gruppe waren $15,86 \pm 2,02 \text{ mm}^2$ nekrotisch. In der OXP-Gruppe betrug der nekrotische Anteil $1,76 \pm 0,41 \text{ mm}^2$, und in der OXP/BVZ-Gruppe lag der Nekroseanteil bei $3,58 \pm 0,95 \text{ mm}^2$ (siehe Abb. 4.3.2).

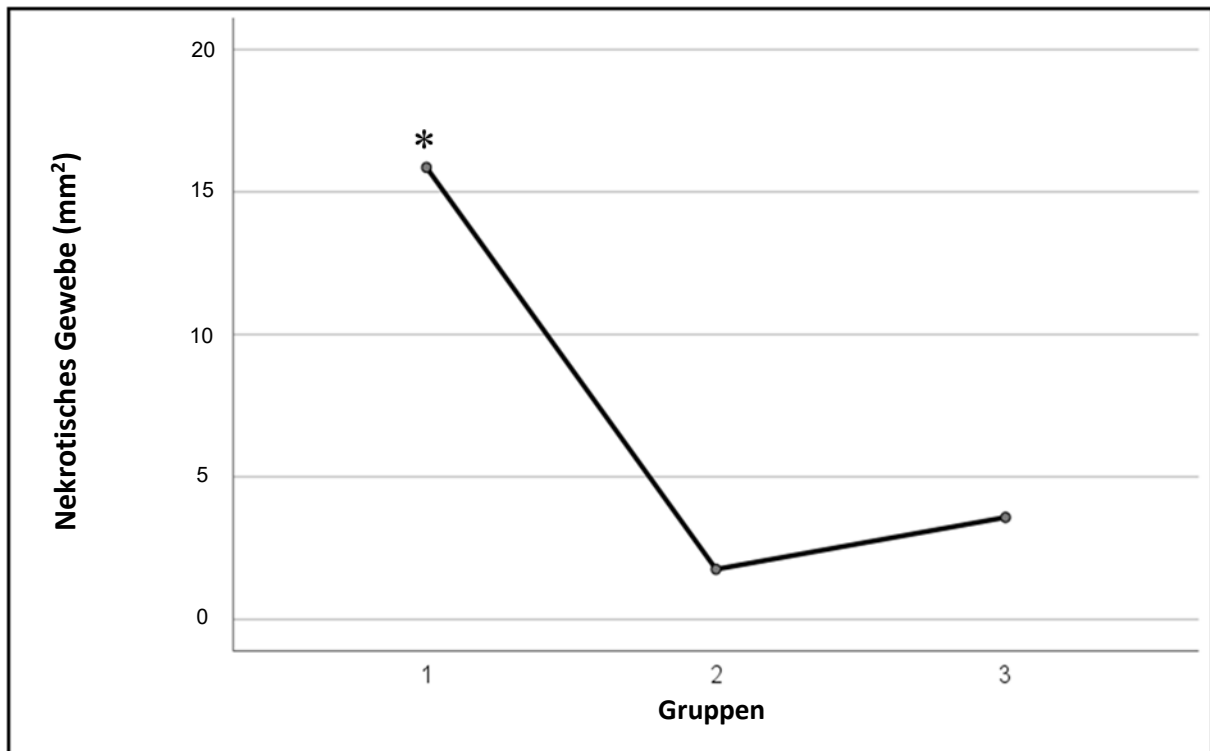


Abb. 4.3.2: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Werte des nekrotischen Gewebes nach der Behandlung. (Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ)

** $p < 0,05$ beim Vergleich der BLM-Gruppe jeweils mit den beiden anderen Gruppen nach der Behandlung.*

Der prozentuale Anteil des nekrotischen Gewebes in der BLM-Gruppe betrug $82,6 \pm 0,1\%$. Im Vergleich dazu waren es in der OXP-Gruppe $11 \pm 0,04\%$ und in der OXP/BVZ-Gruppe $26,3 \pm 0,1\%$ (siehe Abb. 4.3.3 und Abb. 4.3.4).

Nach Durchführung der einfaktoriellen ANOVA und den Post-hoc-Tests wurde festgestellt, dass die BLM-Gruppe statistisch hochsignifikante Unterschiede im Vergleich zur OXP-Gruppe sowie zur OXP/BVZ-Gruppe aufwies (jeweils $p < 0,01$). Im Gegensatz dazu wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den OXP- und OXP/BVZ-Gruppen festgestellt (siehe Abb. 4.3.3).

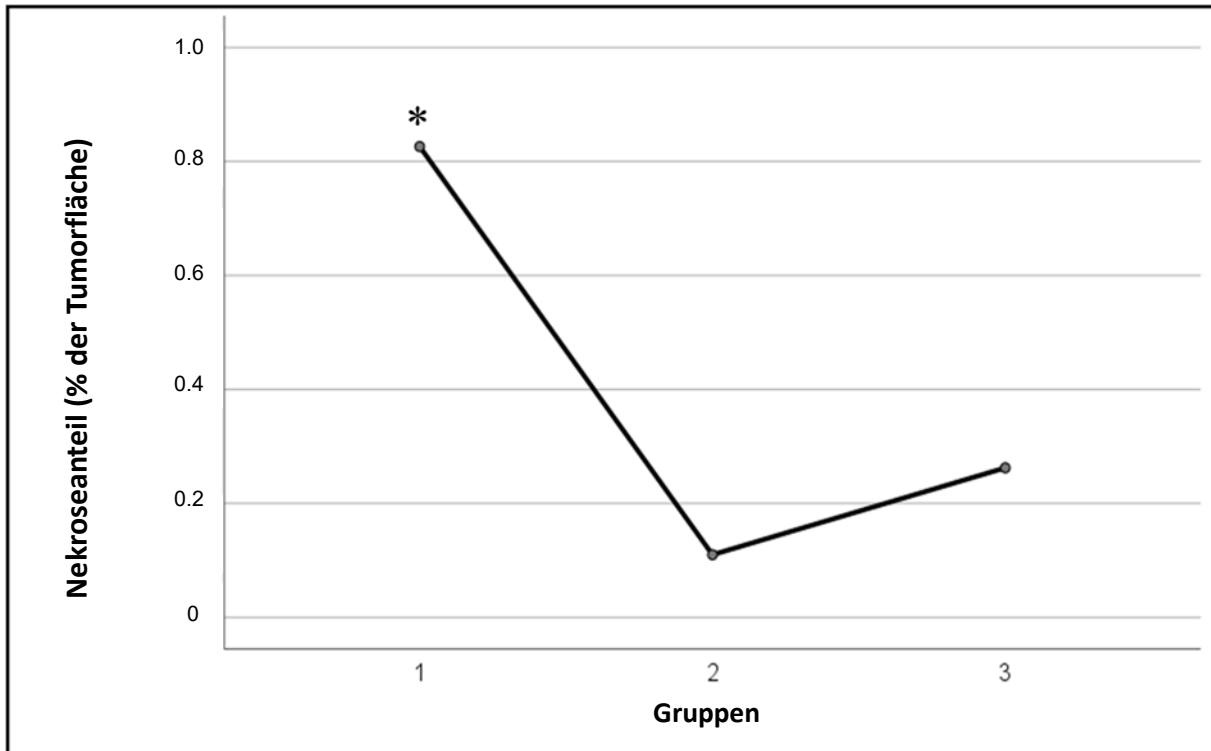


Abb. 4.3.3: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren prozentualen Mittelwerte der Nekrose nach der Behandlung. (Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ)

* $p < 0,05$ beim Vergleich der BLM-Gruppe jeweils mit den beiden anderen Gruppen nach der Behandlung.

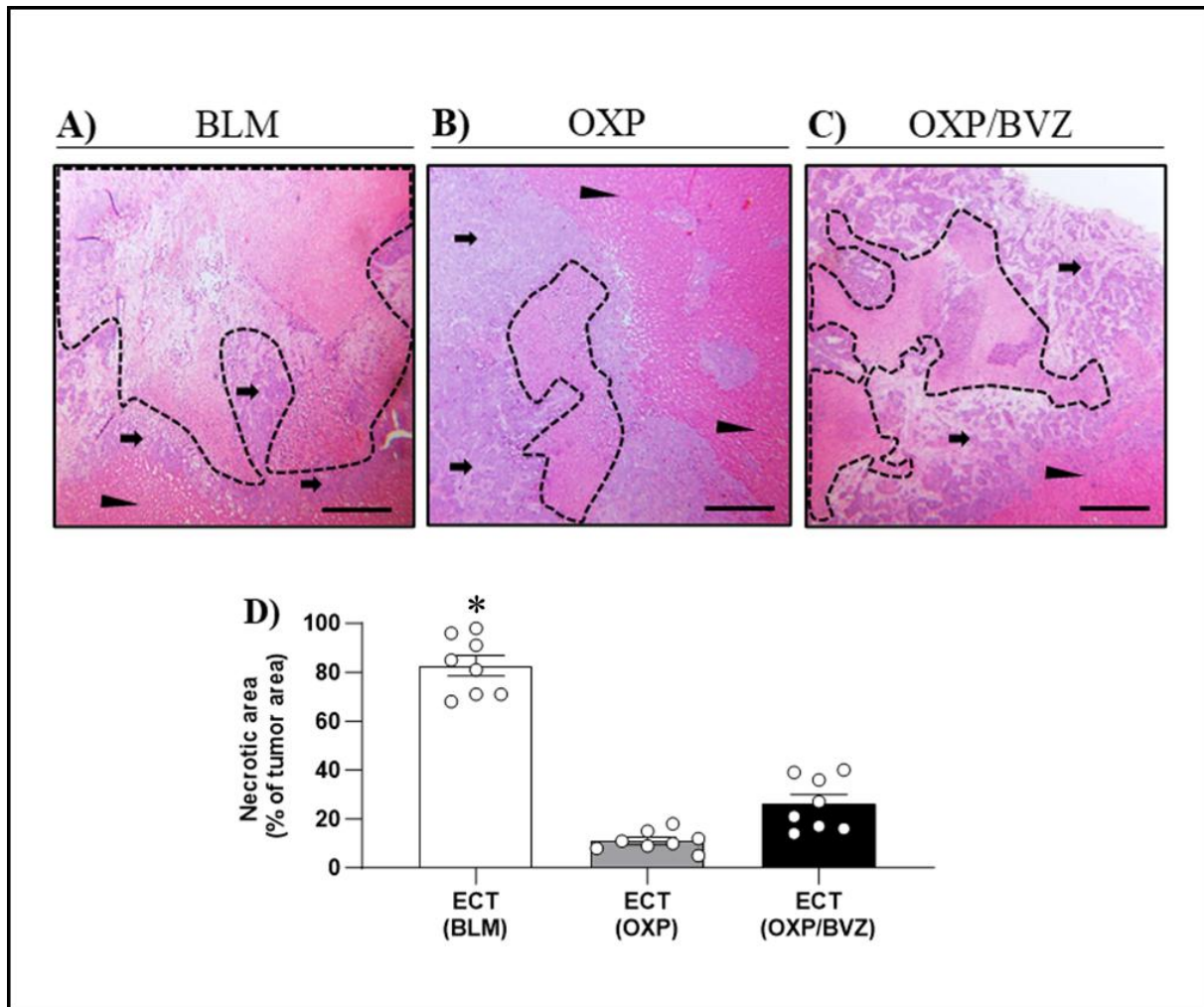


Abb. 4.3.4: Histologische Darstellung der Tumornekrose mittels HE-Färbung und Box-Plot zum Vergleich der mittleren prozentualen Anteile des nekrotischen Areals im Tumorgewebe in den drei Gruppen nach der Behandlung.

A-C) Histologische Darstellung der Nekrose des Tumorgewebes bei Tieren, die mit ECT behandelt wurden und i.v. Verabreichung von BLM (**A**), OXP (**B**) oder OXP/BVZ (**C**) erhielten. Die Grenzen des Tumorgewebes sind durch gestrichelte Linie markiert. Die fibrotische Pseudokapsel mit den verbleibenden Tumorzellen ist durch Pfeile markiert. Normales Lebergewebe ist durch Pfeilspitzen hervorgehoben. Maßstabsbalken: 50 μ m. **D)** Box-Plot-Darstellung der prozentualen Nekrosefläche im Tumorgewebe. Nekrotische Bereiche wurden als Anteil der gesamten Tumorfläche gemessen. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM angegeben; * $p < 0,05$ beim Vergleich der BLM-Gruppe jeweils mit den beiden anderen Gruppen nach der Behandlung.

4.4 Tumorzellproliferation

Zur detaillierten Bewertung der Tumorzellproliferation (PCNA) wurden aufgrund der nominal skalierten Daten in dieser Gruppe Kreuztabellen erstellt und Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. Dabei wurde die asymptotische Signifikanz des Pearson-Chi-Quadrat-Tests zweiseitig berechnet und ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt. Die immunhistochemische Analyse der Tumorzellproliferation zeigte einen auffälligen Anteil an PCNA-positiven Zellen in der OXP-Gruppe ($3,3 \pm 0,3$) sowie in der Gruppe, die OXP in Kombination mit BVZ erhielt ($3,0 \pm 0,3$). Dies entsprach einem Anteil von bis zu 50%. Im Vergleich dazu führte die Behandlung mit BLM zu einer signifikanten Reduktion der proliferierenden Tumorzellen (BLM: $1,8 \pm 0,3$), was in Abbildung 4.4.1 und 4.4.2 illustriert ist.

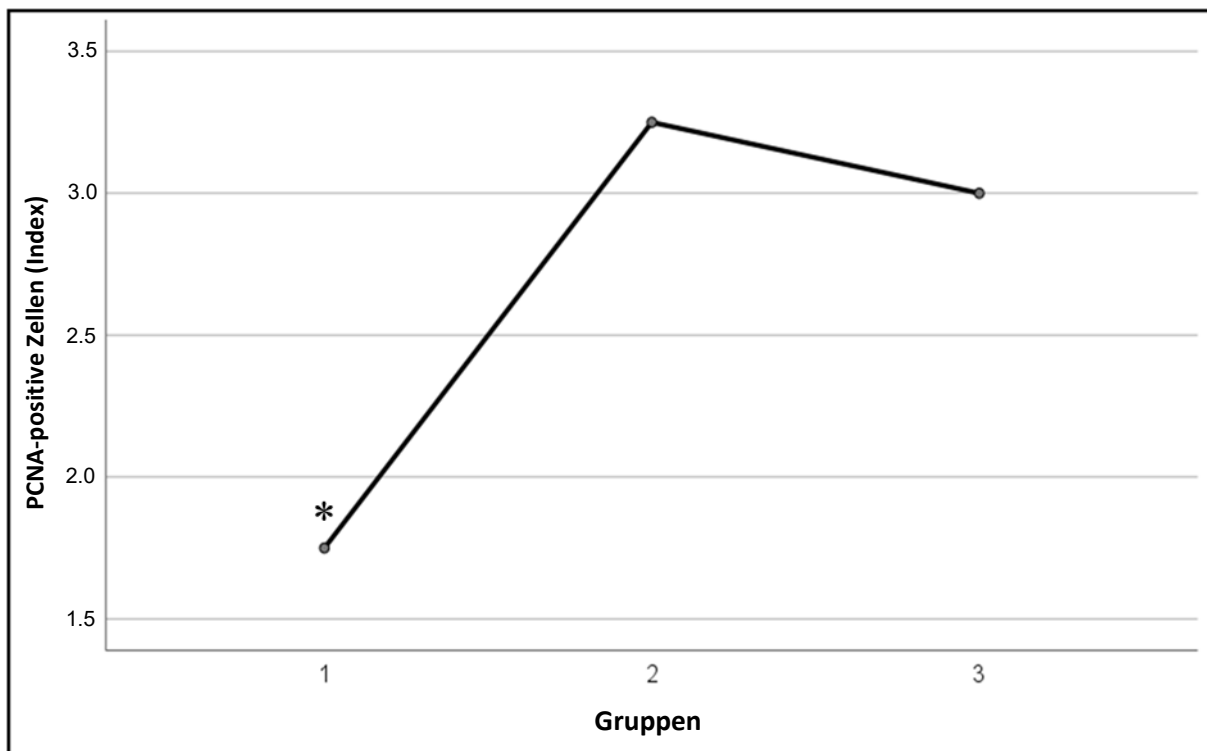


Abb. 4.4.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Anzahl PCNA-positiver Zellen in den drei Behandlungsgruppen.

0 ($\leq 1\%$ PCNA-positive Zellen), 1 (1-10% PCNA-positive Zellen), 2 (10-30% PCNA-positive Zellen), 3 (30-50% PCNA-positive Zellen) und 4 ($\geq 50\%$ PCNA-positive Zellen); (Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ); * $p < 0,05$ beim Vergleich der BLM-Gruppe jeweils mit den beiden anderen Gruppen nach der Behandlung.

Diese deutliche Abnahme der Tumorzellproliferation unter BLM-Behandlung erreichte eine asymptotische Signifikanz von $p = 0,043$, wie durch den Pearson-Chi-Quadrat-Test ermittelt wurde (siehe Abb. 4.4.2).

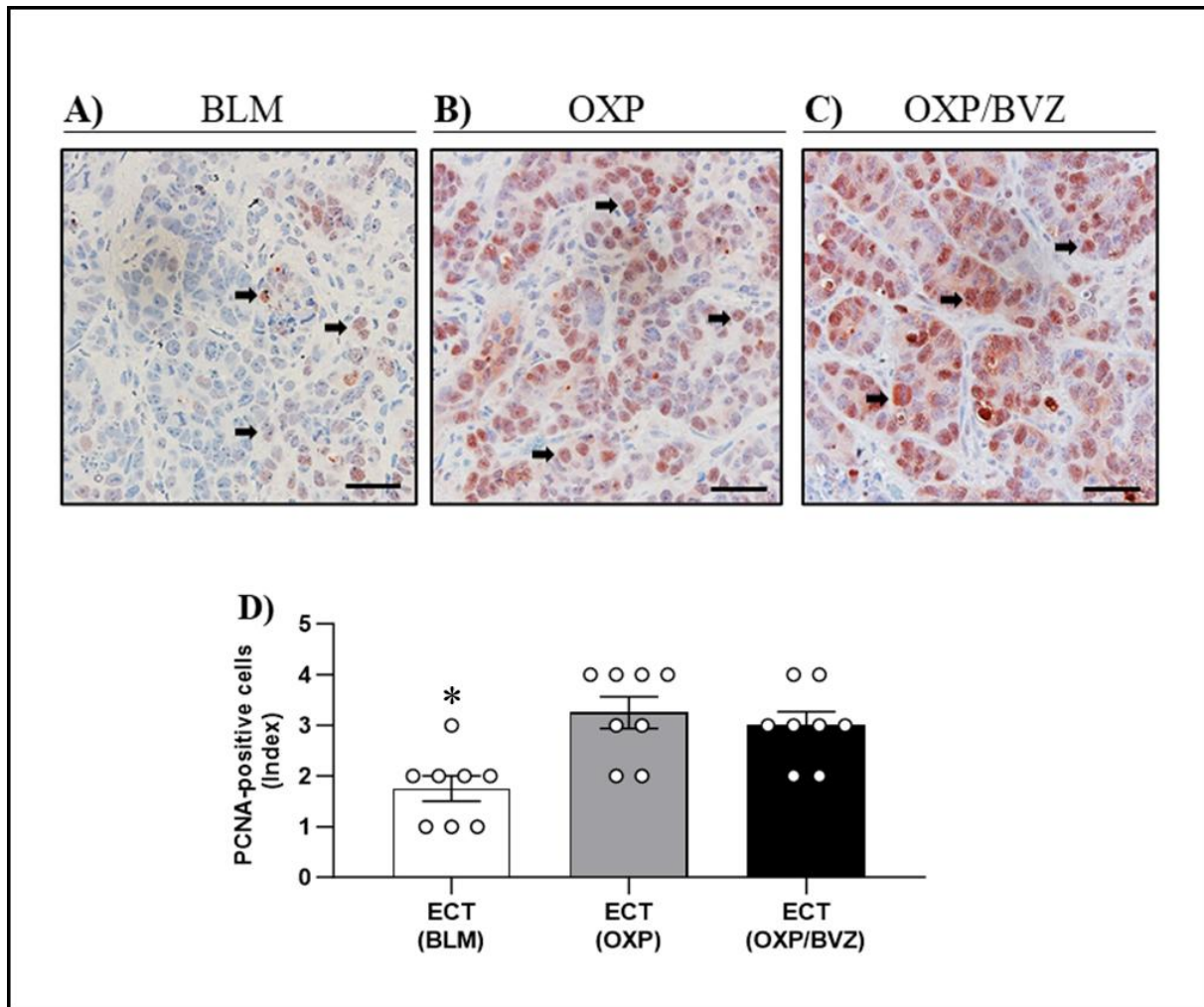


Abb. 4.4.2: Immunhistochemische Darstellung der PCNA-Expression und Box-Plot zum Vergleich des mittleren Anteils PCNA-positiven Zellen in den drei Gruppen nach der Behandlung.

A-C) Immunhistochemische Untersuchung der PCNA-Expression im Tumorgewebe von Tieren, die mit ECT und mit i.v. Verabreichung von BLM (**A**), OXP (**B**) oder OXP/BVZ (**C**) behandelt wurden. PCNA-positive Zellen (Pfeile) sind in brauner Färbung sichtbar. Maßstabsbalken: 50 μ m. **D)** Der Box-Plot präsentiert die quantitative Analyse der PCNA-positiven Zellen (semiquantitativer Index) im Tumorgewebe pro HPF. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt; * $p < 0,05$ (asymptotische zweiseitige Signifikanz des Chi-Quadrat-Tests nach Pears).

4.5 Apoptose

Gespaltene Caspase-3 diente als Marker für apoptotischen Zelltod. Apoptotische Zellen wurden, zusammen mit verbleibenden Tumorzellen, an den Rändern der Ablationszone als rot gefärbte Zellen innerhalb der fibrotischen Pseudokapsel identifiziert. Die Behandlung mit OXP und OXP/BVZ führte zu einer etwa doppelt so hohen Anzahl an Caspase-3-positiven Zellen im Vergleich zur BLM-Gruppe und möglicherweise zu einer deutlich gesteigerten Apoptose von Hepatozyten (BLM: $7,2 \pm 0,7$ pro HPF; OXP: $14,1 \pm 1,4$ pro HPF; OXP/BVZ: $13,3 \pm 1,2$ pro HPF) (siehe Abb. 4.5.1 und Abb. 4.5.2).



Abb. 4.5.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Anzahl Caspase-3-positiver Zellen in den drei Behandlungsgruppen. (Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ)

* $p < 0,05$ beim Vergleich der BLM-Gruppe jeweils mit den beiden anderen Gruppen nach der Behandlung.

Die ANOVA-Analyse zeigte einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit einem p-Wert von weniger als 0,001. Post-hoc-Tests offenbarten einen statistisch hochsignifikanten Unterschied, wenn die OXP- und OXP/BVZ-Gruppen jeweils mit der BLM-Gruppe verglichen wurden ($p < 0,01$). Zwischen den OXP- und OXP/BVZ-Gruppen wurde jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt (siehe Abb. 4.5.1 und Abb. 4.5.2).

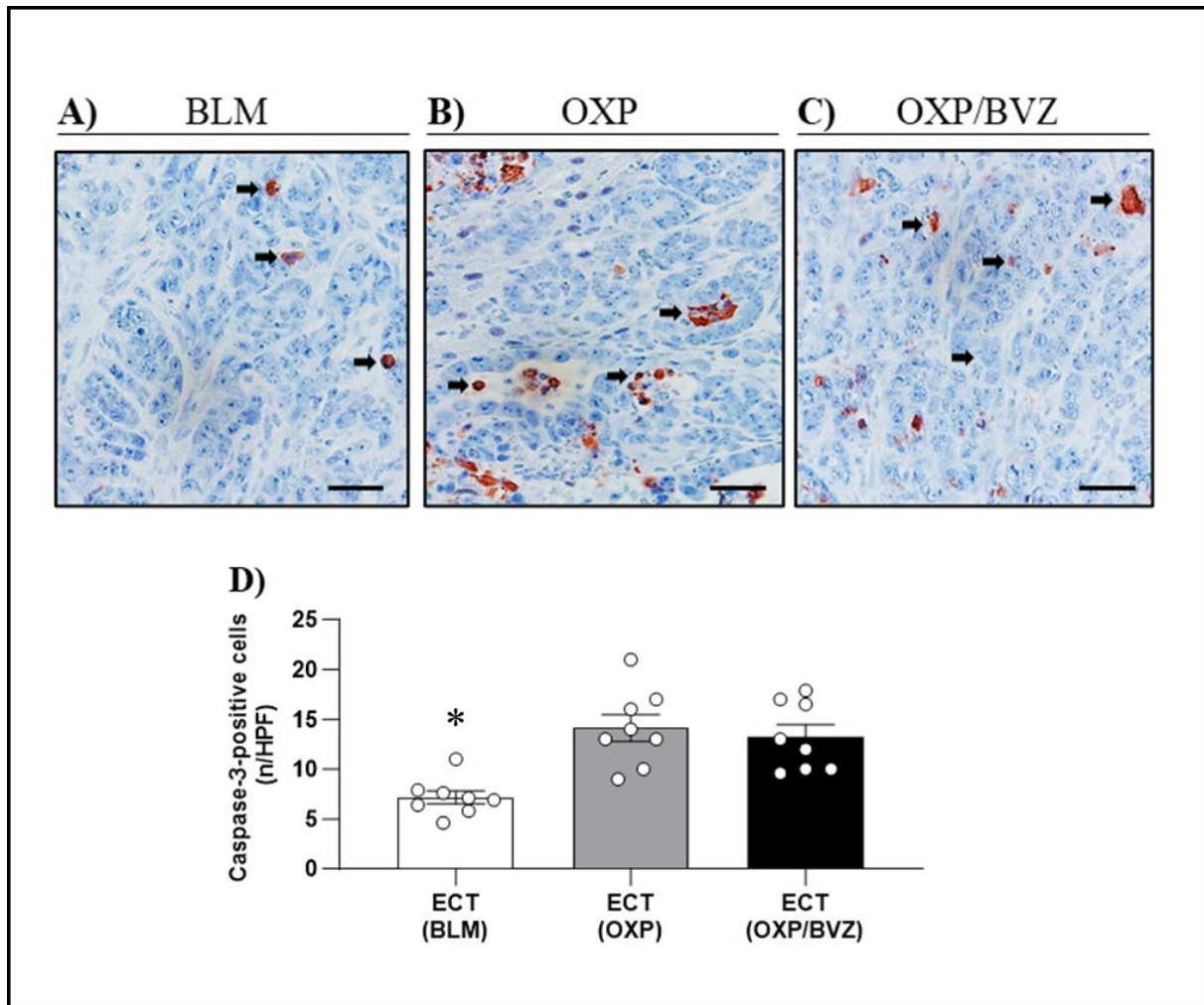


Abb. 4.5.2: Immunhistochemische Darstellung der Caspase-3-positiven Zellen und Box-Plot zum Vergleich der mittleren Anzahl Caspase-3-positiver Zellen in den drei Gruppen nach der Behandlung.

A-C) Immunhistochemische Analyse von gespaltenem Caspase-3 bei Tieren, die mit ECT und i.v. Verabreichung von BLM (A), OXP (B) oder OXP/BVZ (C) behandelt wurden. Apoptotische Zellen (Pfeile) sind rot gefärbt. Maßstabsbalken: 50 μm . **D)** Der Box-Plot zeigt die durchschnittliche Anzahl positiver Zellen im Tumorgewebe pro HPF. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt; * $p < 0,05$ beim Vergleich der BLM-Gruppe jeweils mit den beiden anderen Gruppen nach der Behandlung.

4.6 Entzündungsreaktion

Die immunhistochemische Analyse der MPO-positiven neutrophilen Granulozyten zeigte eine deutlich verringerte Anzahl inflammatorischer Zellen im Tumorgewebe nach der BLM-Behandlung im Vergleich zu den OXP- und OXP/BVZ-Gruppen. Diese Unterschiede sind in den Abbildungen 4.6.1 und 4.6.2 dargestellt (BLM: $7,1 \pm 0,6$ Zellen pro HPF; OXP: $10,1 \pm 1,4$ Zellen pro HPF; OXP/BVZ: $11 \pm 0,9$ Zellen pro HPF).

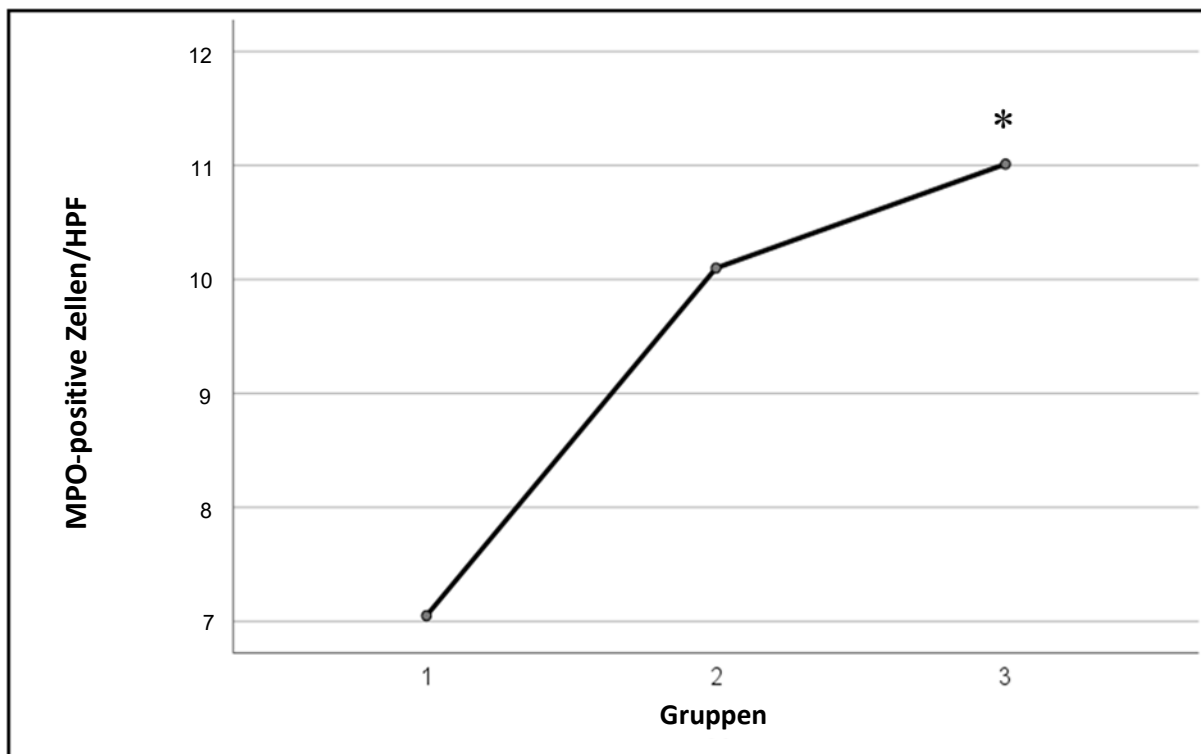


Abb. 4.6.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Anzahl MPO-positiver Zellen in den drei Behandlungsgruppen. (Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ)

* $p < 0,05$ beim Vergleich der OXP/BVZ-Gruppe mit der BLM-Gruppe nach der Behandlung.

Die ANOVA-Analyse zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit einem Signifikanzniveau von $p = 0,034$. Nach den Post-hoc-Tests ist besonders hervorzuheben, dass der Anstieg der inflammatorischen Zellen in der OXP/BVZ-Gruppe im Vergleich zur BLM-Gruppe signifikant höher und statistisch bedeutsam war ($p = 0,014$), was auf eine verstärkte Immunantwort in dieser Gruppe hindeutet. Auch die Verabreichung von OXP führte zu einer Zunahme der inflammatorischen Zellen im Vergleich zur BLM-Gruppe. Dieser Anstieg erreichte jedoch keine statistische Signifikanz, wie in Abbildung 4.6.1 und 4.6.2 dargestellt.

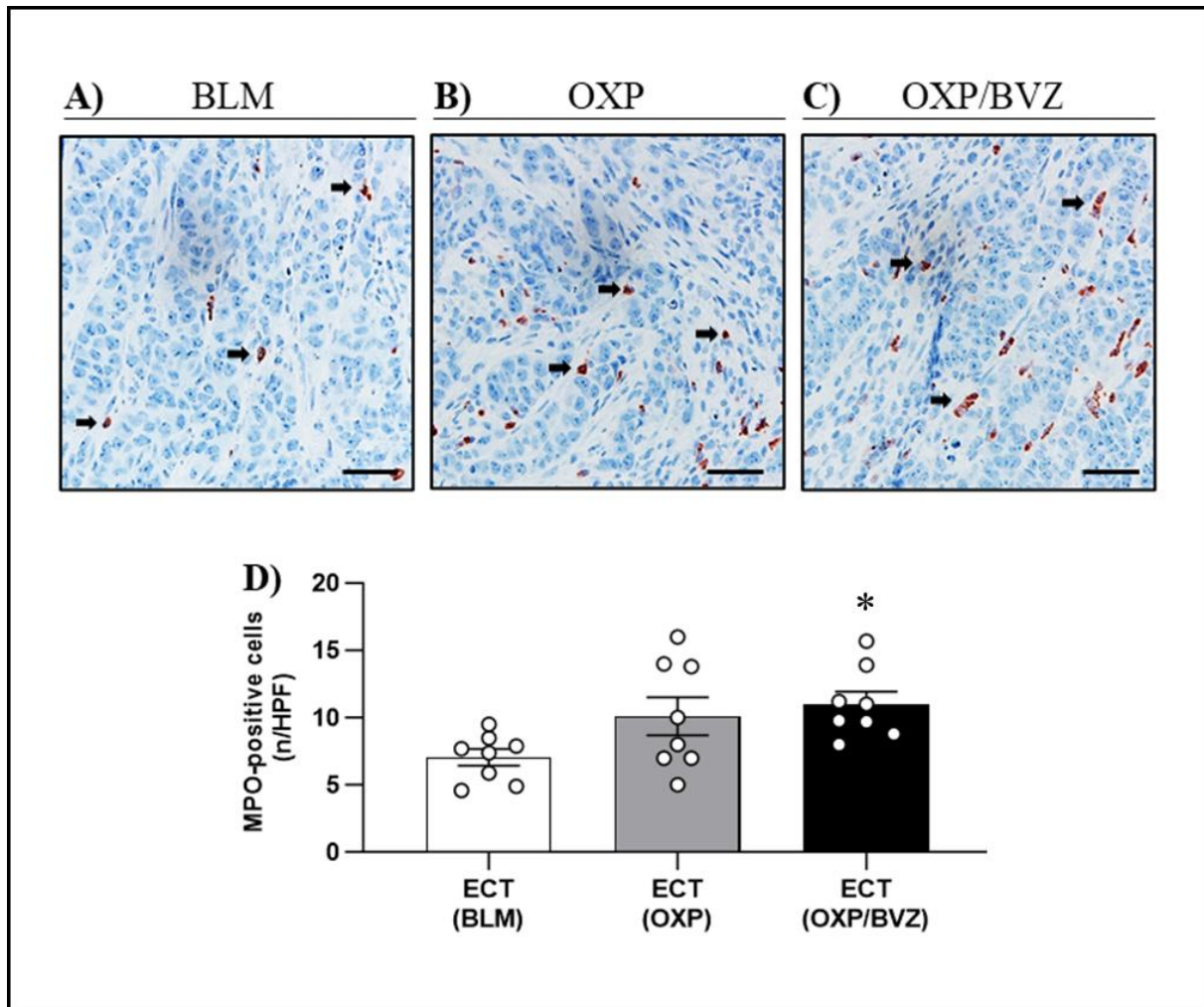


Abb. 4.6.2: Immunhistochemische Darstellung der MPO-positiven Zellen und Box-Plot zum Vergleich der mittleren Anzahl MPO-positiver Zellen in den drei Gruppen nach der Behandlung.

A-C) Immunhistochemische Untersuchung der MPO-Expression im Tumorgewebe von Tieren nach Behandlung mit ECT und i.v. Verabreichung von BLM (A), OXP (B) oder OXP/BVZ (C). MPO-positive Zellen sind durch rote Färbung gekennzeichnet (Pfeile). Maßstabsbalken: 50 μ m. D) Der Box-Plot zeigt die quantitative Analyse der MPO-positiven Zellen im Tumorgewebe pro HPF. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt; * $p < 0,05$ beim Vergleich der OXP/BVZ-Gruppe mit der BLM-Gruppe nach der Behandlung.

4.7 Angiogenese

Die immunhistochemische Analyse der CD31-positiven Mikrogefäße zeigte eine deutliche Reduktion der Mikrovaskularisation in den Gruppen, die mit BLM ($69,9 \pm 11,3 \text{ mm}^{-2}$) und OXP/BVZ ($80,6 \pm 4,6 \text{ mm}^{-2}$) behandelt wurden, im Vergleich zur Gruppe, die nur mit OXP behandelt wurde ($95 \pm 4,5 \text{ mm}^{-2}$) (siehe Abb. 4.7.1 und Abb. 4.7.2). Dies deutet darauf hin, dass die Behandlungen mit BLM und OXP/BVZ die Bildung von Mikrogefäßen im Tumorgewebe signifikant vermindern könnten.

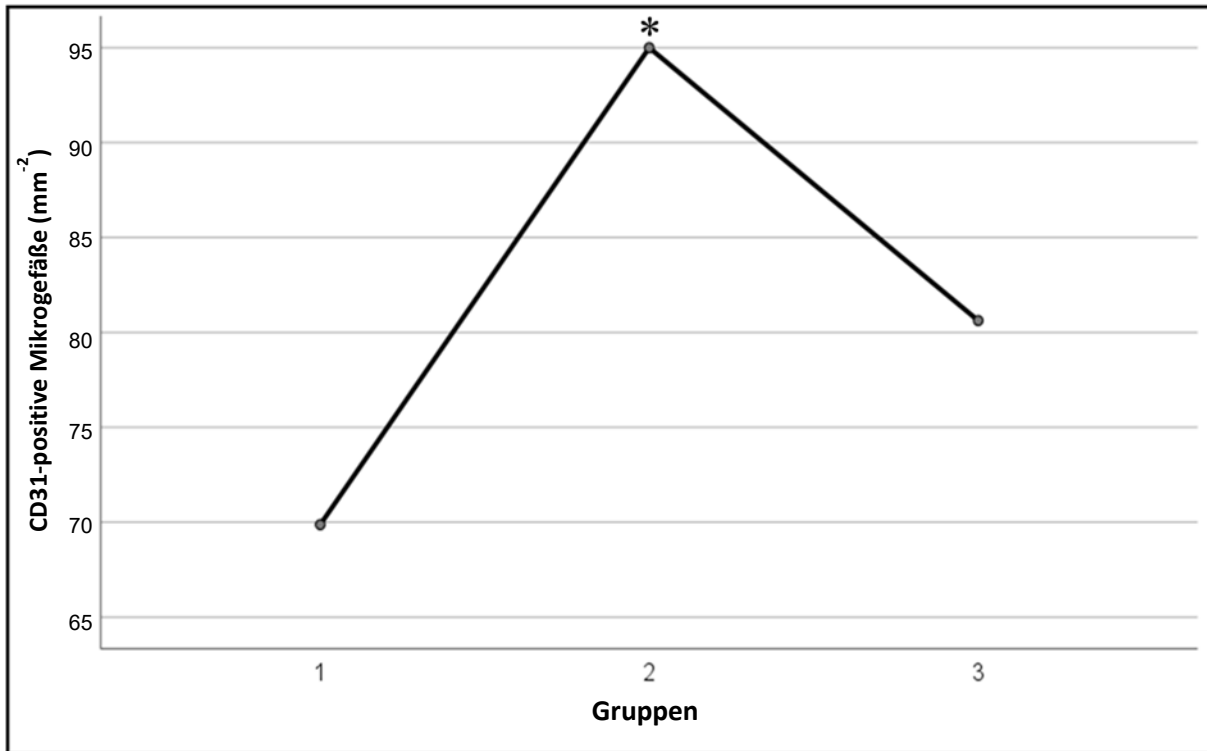


Abb. 4.7.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Anzahl CD31-positiver Mikrogefäßen in den drei Behandlungsgruppen. (Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ)

* $p < 0,05$ beim Vergleich der OXP-Gruppe mit der BLM-Gruppe nach der Behandlung.

Obwohl die ANOVA-Analyse keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen zeigte ($p = 0,078$), ergaben die Post-hoc-Tests einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der BLM- und der OXP-Gruppe, wobei ein Signifikanzniveau von $p = 0,026$ erreicht wurde. Dies weist darauf hin, dass die BLM-Behandlung im Vergleich zu OXP eine signifikant stärkere Reduktion der Mikrovaskularisation bewirkte. Obwohl die Behandlung mit OXP/BVZ ebenfalls zu einer Abnahme der CD31-positiven Mikrogefäße im Vergleich zur OXP-Gruppe führte, erreichte dieser Unterschied keine statistische Signifikanz ($p = 0,185$) (siehe Abb. 4.7.1 und Abb. 4.7.2).

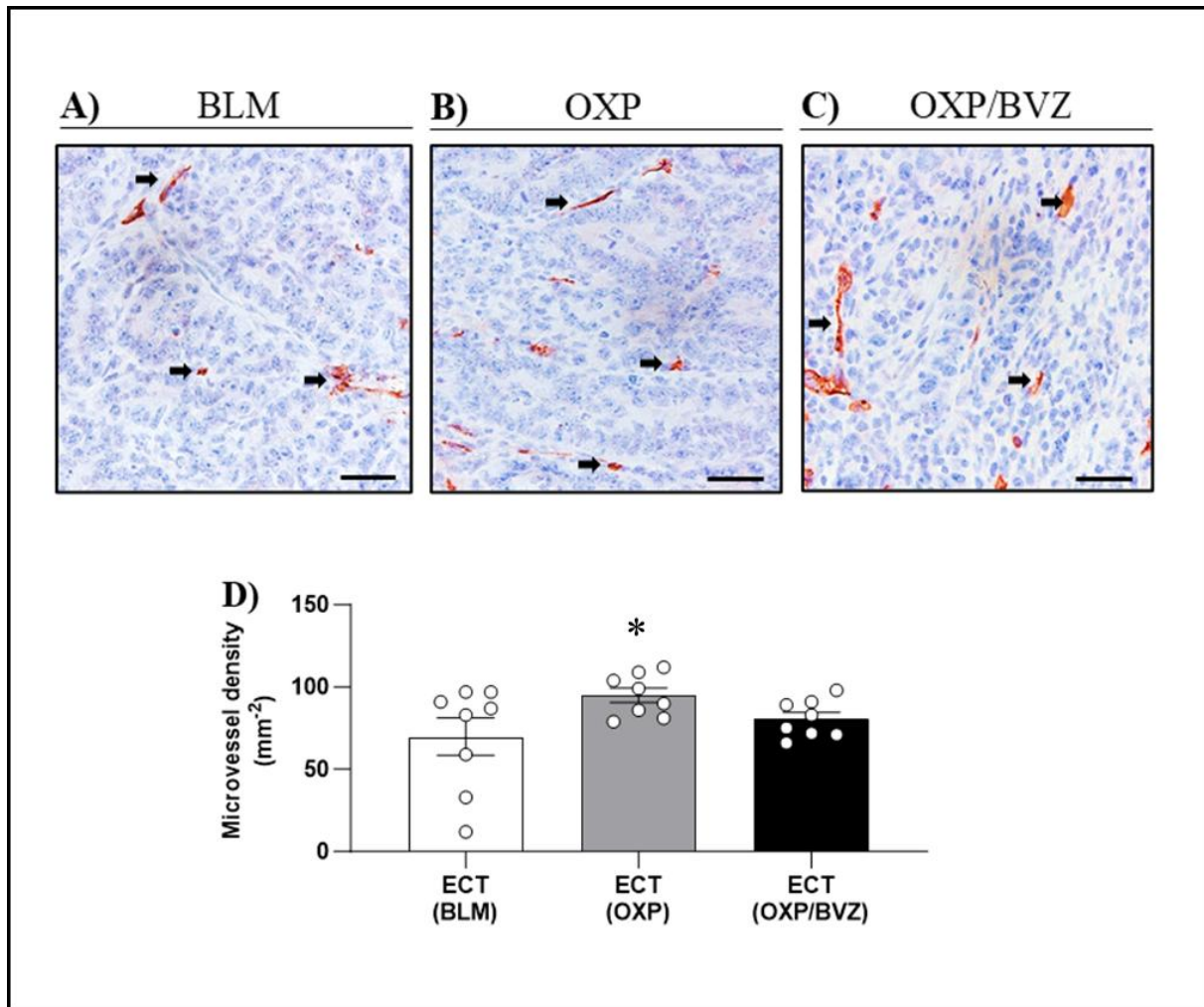


Abb. 4.7.2: Immunhistochemische Darstellung der CD31-positiven Mikrogefäßen und Box-Plot zum Vergleich der mittleren Anzahl CD31-positiver Mikrogefäßen in den drei Gruppen nach der Behandlung.

A-C) Immunhistochemische Analyse der CD31-Expression bei Tieren, die mit ECT und i.v. Verabreichung von BLM (A), OXP (B) oder OXP/BVZ (C) behandelt wurden. CD31-positive Mikrogefäße (Pfeile) sind rot gefärbt. Maßstabsbalken: 50 µm. **D)** Das Diagramm zeigt die quantitative Analyse der CD31-positiven Mikrogefäße im Tumorgewebe. Die Mikrogefäßdichte wird als positive Blutgefäße (in 10 HPFs) pro mm⁻² angegeben; * $p < 0,05$ beim Vergleich der OXP -Gruppe mit der BLM-Gruppe nach der Behandlung.

4.8 Serologische Untersuchungen

Die Analyse der weißen Blutkörperchen, einschließlich Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten, zeigte am Tag 13 in allen untersuchten Gruppen physiologische Werte, die innerhalb der normalen Referenzbereiche lagen. Dies deutet darauf hin, dass die Immunantwort der Tiere durch die Tumorentwicklung und die Behandlungen nicht stark beeinträchtigt wurde. Die Leukozyten-, Lymphozyten- und Monozytenzahlen waren in den Behandlungsgruppen mit BLM und OXP leicht erhöht im Vergleich zur Gruppe mit OXP/BVZ, wobei diese Werte jedoch die normalen Referenzbereiche nicht überschritten.

Die Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen blieben ebenfalls in allen Gruppen stabil und innerhalb der erwarteten Normbereiche. Ebenso waren die Hb- und HKT-Werte in allen Gruppen im physiologischen Bereich. Dennoch wurden in der OXP/BVZ-Gruppe im Vergleich zu den BLM- und OXP-Gruppen geringfügig höhere Werte beobachtet.

Diese Unterschiede zwischen den Gruppen, insbesondere in Bezug auf die weißen Blutkörperchen und die Hb- sowie HKT-Werte, erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Dies legt nahe, dass die verschiedenen Behandlungen die Blutparameter im Allgemeinen nicht signifikant beeinflussten und dass die beobachteten Variationen möglicherweise durch individuelle Unterschiede oder zufällige Schwankungen verursacht wurden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die verabreichten Therapien keine schwerwiegenden Auswirkungen auf die systemische Hämatologie der Tiere hatten und die Tiere über den gesamten Behandlungszeitraum eine stabile Blutphysiologie aufrechterhalten konnten.

Tabelle 4.8.1: Ergebnisse der serologischen Untersuchung am Tag 13. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM angegeben.

	BLM	OXP	OXP/BVZ
Leukozyten ($10^9/L$)	$9,5 \pm 1$	$9,7 \pm 0,7$	$8,9 \pm 0,5$
Lymphozyten ($10^9/L$)	$4,6 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,2$
Monozyten ($10^9/L$)	$0,9 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$
Neutrophile Granulozyten ($10^9/L$)	$4,1 \pm 0,9$	$4,5 \pm 0,6$	$4,1 \pm 0,5$
Erythrozyten ($10^{12}/L$)	$6,8 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,2$
Thrombozyten ($10^9/L$)	604 ± 36	$584 \pm 49,4$	$592 \pm 38,2$
Hämoglobin (g/dL)	$13,1 \pm 0,3$	$12,9 \pm 0,2$	$13,3 \pm 0,2$
Hämatokrit (%)	$37,3 \pm 1$	$36,4 \pm 1,2$	$38,1 \pm 0,8$

4.9 Unerwünschte Ereignisse

In der vorliegenden Studie wurden keine unerwünschten Ereignisse oder Komplikationen im Zusammenhang mit der Einführung von Elektroden, der Applikation elektrischer Impulse oder der Verabreichung der Medikamente festgestellt. Die sorgfältige Überwachung sämtlicher potenzieller Risiken und Nebenwirkungen spielte dabei eine zentrale Rolle, um die Sicherheit der Tiere während des gesamten Experiments zu gewährleisten. Besonders hervorzuheben ist, dass trotz der invasiven Natur der eingesetzten Methoden keinerlei klinische Anzeichen einer systemischen Entzündungsreaktion oder eines Leberversagens bei den Versuchstieren beobachtet wurden, was auf eine hohe Verträglichkeit der Verfahren hinweist.

Die Abwesenheit schwerwiegender Nebenwirkungen bestätigt, dass sowohl die ECT als auch die i.v. Verabreichung von BLM, OXP und OXP/BVZ bei den Tieren keine negativen Auswirkungen auf ihre allgemeine Gesundheit hatten. Auch auf der histopathologischen Ebene wurden keine Hinweise auf eine akute Schädigung von Lebergewebe oder anderen Organen festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass die Methoden und Substanzen nicht nur sicher, sondern auch gut verträglich sind.

Darüber hinaus zeigte sich im Verlauf der gesamten Studie, dass die Tiere trotz der Behandlungen ihre normalen physiologischen Funktionen beibehielten, was sich in stabilen Vitalparametern und Verhaltensweisen, wie Nahrungsaufnahme, Aktivitätsniveau und Reinigungsgewohnheiten, widerspiegelte. Diese Beobachtungen sind von besonderer Bedeutung, da sie darauf hinweisen, dass die in der Studie angewandten therapeutischen Ansätze nicht zu einer systemischen Belastung der Tiere führten.

Die Abwesenheit unerwünschter Effekte unterstreicht nicht nur die Sicherheit der eingesetzten Interventionen, sondern auch deren potenzielle klinische Relevanz. Diese Ergebnisse sind ermutigend und legen nahe, dass die in dieser präklinischen Studie getesteten Verfahren eine vielversprechende Grundlage für die weitere Entwicklung und Anwendung in der klinischen Praxis darstellen könnten. Die hohe Verträglichkeit und das Fehlen negativer Auswirkungen auf die Leber und das allgemeine Wohlbefinden der Tiere sind entscheidende Faktoren, die für die Sicherheit und Effektivität der ECT in zukünftigen klinischen Studien sprechen.

5. Diskussion

In dieser Studie wurden die chemotherapeutischen Substanzen BLM, OXP und die Kombination aus OXP und BVZ in der Behandlung von KRLM verwendet und miteinander verglichen. Alle Gruppen wurden mittels ECT behandelt, da bereits in unserer ersten Studie die Vorteile der ECT gegenüber der alleinigen Behandlung mit RE und der alleinigen i.v. Verabreichung von Chemotherapie ohne RE bei KRLM aufgezeigt wurden (SPILIOTIS et al., 2023). Nachdem die Sicherheit und Machbarkeit von ECT im Vergleich zu den anderen genannten Behandlungsmethoden nachgewiesen worden waren, testeten wir in einer weiteren Studie verschiedene Verabreichungswege der Chemotherapie (i.v., i.t. oder i.v. + i.t.) (SPILIOTIS et al., 2024). Die onkologischen Ergebnisse zeigten keine Verbesserung bei der Kombination aus i.v.- und i.t.-Verabreichung im Vergleich zur alleinigen i.v.- oder i.t.-Verabreichung. Da die i.v.-Verabreichung von Chemotherapeutika in der klinischen Praxis das übliche Verfahren darstellt, wurde der i.v.-Weg empfohlen und entsprechend in unserer Studie angewandt. In unseren beiden vorherigen Studien kam ECT unter Verwendung von BLM als chemotherapeutisches Mittel zum Einsatz, da nachgewiesen wurde, dass die Zytotoxizität durch die Kombination mit RE um bis zu 1000-fach verstärkt werden kann (PROBST et al., 2018).

5.1 Interpretation der Nekrose und des apoptotischen Zelltodes

Im behandelten Bereich wurde Nekrose beobachtet, während im normalen Leberparenchym keine Nachweise erbracht werden konnten. Die BLM-Gruppe wies einen signifikant höheren Anteil an nekrotischem Gewebe (82,6%) im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen auf, die mit OXP und OXP/BVZ behandelt wurden (11% bzw. 26,3%). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unserer vorherigen Studie, die eine höhere Wirksamkeit von BLM in Kombination mit RE demonstrierte (SPILIOTIS et al., 2023). Dieses Ergebnis wird nicht nur den Wirkmechanismen von RE zugeschrieben, sondern auch den synergistischen Effekten, die durch die Kombination von hydrophilen Arzneimitteln wie BLM und OXP mit RE entstehen (PROBST et al., 2018). Die Anwendung von RE führt zu einer lokalen Erhöhung der Zellpermeabilität für hydrophile Substanzen, die in der Regel nur eine eingeschränkte Fähigkeit zur Durchdringung von Zellmembranen aufweisen, wie in der Einleitung erläutert wurde (CONDELLO et al., 2022).

Darüber hinaus beeinflussen die Wirkmechanismen unterschiedlicher Chemotherapeutika auch das Ausmaß der Nekrosebildung. Obwohl BLM überwiegend Apoptose induziert, kann unter bestimmten Bedingungen, wie ausgeprägtem oxidativem Stress und erhöhten Spiegelreaktiver Sauerstoffspezies (ROS), auch Nekrose auftreten (JING et al., 2019; VERNOLE et al., 1998). Es ist plausibel anzunehmen, dass solche Bedingungen in der aktuellen Studie vorlagen, was das höhere Maß an Nekrose in der BLM-Gruppe begünstigte.

Die OXP- und OXP/BVZ-Gruppen zeigten einen geringeren Anteil an nekrotischem Gewebe, wobei statistisch hochsignifikante Unterschiede im Vergleich zur BLM-Gruppe beobachtet wurden (jeweils $p < 0,01$). Der Vergleich dieser beiden Gruppen mit der BLM-Gruppe ergab einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,01$). Es wurde berichtet, dass Elektroporationspulse die Zellaufnahme von BLM effektiver steigern als die von platinbasierten Medikamenten, wie Cisplatin (MIR, 2006). Während platinbasierte Medikamente überwiegend Apoptose induzieren, kann unter bestimmten Bedingungen auch Nekrose auftreten, insbesondere bei höheren Medikamentenkonzentrationen oder wenn apoptotische Signalwege beeinträchtigt sind (GREENLEE et al., 2021). In der vorliegenden Studie ist es jedoch unwahrscheinlich, dass solche Bedingungen vorlagen, da die verwendeten SPF-Tiere weder Mutationen aufwiesen noch gesundheitlich beeinträchtigt waren. Zudem wurde die Chemotherapie bewusst nicht in exzessiv hoher Dosierung verabreicht, um unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren.

Die Apoptose wurde in allen drei Gruppen anhand des gespaltenen Caspase-3 als Indikator des apoptotischen Zelltodes bewertet. Während der Ausführungsphase der Apoptose spielt eine Kaskade von Caspasen eine entscheidende Rolle. Sowohl die intrinsischen als auch die extrinsischen apoptotischen Signalwege konvergieren an Caspase-3, einem zentralen Enzym in diesem Prozess (GALLUZZI et al., 2018).

Die Ergebnisse zeigten, dass beide Gruppen, die OXP erhielten, eine höhere Anzahl an apoptotischen Zellen aufwiesen. Konkret ergaben die OXP- und OXP/BVZ-Gruppen einen Mittelwert von 14,1 bzw. 13,3 positive Zellen pro HPF. Im Gegensatz dazu verzeichnete die BLM-Gruppe eine statistisch signifikant niedrigere Anzahl positiver apoptotischer Zellen, mit einem Mittelwert von 7,2 pro HPF und einem p-Wert von weniger als 0,01 im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Diese Befunde lassen sich durch die Wirkmechanismen von Platinverbindungen erklären, die DNA-Addukte und Interstrand-Crosslinks bilden, welche für Zellen schwer reparierbar sind. Dies führt zu einer verlängerten DNA-Schadensantwort, einem Zellzyklus-Arrest sowie zur Aktivierung sowohl intrinsischer als auch extrinsischer apoptotischer Signalwege in Kolonkarzinomzellen. Im Gegensatz dazu induziert BLM vorwiegend Einzelstrangbrüche durch ROS, die häufig durch DNA-Reparaturmechanismen der Zelle behoben werden können (ARANGO et al., 2004; EASTMAN, 1987; WANG und LIPPARD, 2005; ZHOU et al., 2020). Diese Ergebnisse könnten erklären, warum bei der OXP-basierten Chemotherapie signifikant mehr Caspase-3-positive Zellen nachgewiesen wurden im Vergleich zur BLM-Gruppe.

5.2 Interpretation der Ultraschall- und photoakustischen Bildgebung

Die einbezogenen Tiere wiesen vergleichbare Tumorentwicklungen und -eigenschaften auf. Am Behandlungstag zeigten die sonographischen und photoakustischen Untersuchungen, dass das Tumorumfolumen sowie die Werte für SO_2 und HbT in den untersuchten Gruppen vergleichbar waren. Folglich wurden die verschiedenen Behandlungsansätze an Tumoren mit ähnlicher Biologie sowie vergleichbarem Volumen und ähnlicher Vaskularisierung untersucht.

Die Ergebnisse der Ultraschall- und photoakustischen Bildgebung zeigten eine Reduktion von SO_2 und HbT in den Tumoren aller drei Gruppen. Nahezu alle Gruppen wiesen bei der Analyse der Werte vor und nach der Behandlung eine statistisch signifikante Veränderung auf. Diese Reduktion kann den vaskulären Effekten der ECT zugeschrieben werden, die bereits in der Einleitung genannt und erläutert wurden. Die Oxygenierung und Perfusion von Tumoren werden durch die ECT über den sogenannten “vascular disrupting effect” und den “vascular lock effect” beeinflusst. Der “vascular disrupting effect” beschreibt, wie RE die Permeabilität sowohl in Tumorzellen als auch in Endothelzellen erhöht, was zu einer Unterbrechung des Blutflusses und zu einem ischämischen Zelltod benachbarter Tumorzellen führt (MIKLAVČIČ et al., 2014). Der “vascular lock effect” hingegen beruht auf einer Vasokonstriktion sowie auf Formveränderungen der Endothelzellen, die zu einem erhöhten vaskulären Widerstand und gestörten Zellverbindungen führen. Dies resultiert in einem Proteinverlust, einem erhöhten interstitiellen Druck und einem reduzierten intravaskulären Druck, was zur Hypoperfusion beiträgt. Die Hypoperfusion begünstigt die Therapie, indem sie Arzneimittel im Tumorgewebe zurückhält, die Verweildauer verlängert und Blutungen während des Eingriffs verhindert (GEBOERS et al., 2020; MIKLAVČIČ et al., 2014; PROBST et al., 2018).

Nach dem Vergleich der SO_2 -Werte vor und nach der Behandlung wies die BLM-Gruppe eine stärkere Reduktion des SO_2 (33,7%) auf als die beiden anderen Gruppen. Die Analyse der SO_2 -Werte nach der Behandlung ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der BLM-Gruppe und den beiden anderen Gruppen ($p < 0,01$). Die signifikante Reduktion der SO_2 -Werte in der BLM-behandelten Gruppe lässt sich durch die extensive Nekrose erklären, die durch BLM induziert wird. Darüber hinaus spielt der sauerstoffabhängige Mechanismus von BLM eine entscheidende Rolle, der die Produktion von ROS umfasst, wie bereits erläutert wurde. Studien haben gezeigt, dass die zytotoxische Aktivität von BLM in gut oxygenierten Geweben verstärkt werden kann. Dies liegt daran, dass BLM während des Prozesses aktiv O_2 verbraucht, was zu einer lokalen Hypoxie in zuvor gut durchbluteten Tumoren führt (CHEN und STUBBE, 2005). Dieses Phänomen könnte die ausgeprägtere Reduktion der Tumoroxygenierung nach der BLM-Behandlung erklären.

Im Gegensatz dazu entfaltet OXP seine antitumorale Wirkung durch die Bildung von Platin-DNA-Addukten, die DNA-Quervernetzungen verursachen und zur Apoptose führen, unabhängig vom Sauerstoffstatus des Tumors (FAIVRE et al., 2003; RAYMOND et al., 1998). Ähnlich wie BLM kann auch OXP ROS erzeugen, was auf den platininduzierten oxidativen Stress innerhalb von Krebszellen zurückzuführen ist. Studien haben gezeigt, dass OXP oxidativen Stress induzieren kann, indem es die mitochondriale Funktion beeinträchtigt, was zur Produktion von ROS führt und zur Verstärkung seiner apoptotischen Effekte beiträgt (WANG und LIPPARD, 2005). Die Menge an ROS, die durch OXP erzeugt wird, ist jedoch in der Regel geringer, als die von Medikamenten wie BLM, deren Zytotoxizität auf oxidativen Mechanismen basiert (CHEN und STUBBE, 2005; RAYMOND et al., 1998). Das könnte darauf hindeuten, dass OXP, trotz seiner Fähigkeit zur Erzeugung von ROS, im Vergleich zu BLM

möglicherweise nicht in gleichem Ausmaß zu einer ausgeprägten Reduktion der Oxygenierung in KRLM beiträgt.

Ähnlich wie die beobachtete Abnahme der SO_2 -Werte im Tumor kann die Reduktion der HbT-Werte in allen drei Gruppen den Effekten der ECT auf die Tumoroxygenierung und -perfusion zugeschrieben werden. Diese Effekte sind entscheidend für das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen der ECT und der tumorbedingten Mikroumgebung. Die stärkste Reduktion des HbT wurde in der BLM-Gruppe beobachtet, wobei eine Abnahme von 12,7% im Vergleich der prä- und posttherapeutischen Werte festgestellt wurde, was auf die signifikante Beeinflussung der Tumorperfusion durch die Behandlung hinweist ($p < 0,01$). Im Gegensatz dazu zeigte die Gruppe, die ausschließlich mit OXP behandelt wurde, lediglich eine geringfügige Reduktion von 2,1%, was darauf hindeutet, dass die Wirkung von OXP auf die Tumorperfusion im Vergleich zu BLM weniger ausgeprägt ist. Diese Unterschiede verdeutlichen die unterschiedlichen Wirkmechanismen und deren Einfluss auf die tumorassoziierte vaskuläre Dynamik.

Wie bereits dargelegt, kann der durch BLM verursachte Sauerstoffverbrauch, der eine lokale Hypoxie im Tumorgewebe induziert, nicht nur die Oxygenierung, sondern auch die Hb-Spiegel verringern. Diese Hypoxie führt zu einer Reduktion der Hämodynamik und kann die vaskuläre Schädigung verstärken, was letztlich zu einem verminderten Blutfluss und einer geringeren Hb-Versorgung des Tumors führt. Dieser Prozess verstärkt den Abfall der Oxygenierung weiter und hat tiefgreifende Auswirkungen auf die Tumorpathophysiologie (CHEN und STUBBE, 2005). Im Gegensatz dazu konnte ein direkter Einfluss platinbasierter Chemotherapeutika auf die Angiogenese in der wissenschaftlichen Literatur bislang nicht abschließend nachgewiesen werden (MARZO et al., 2022). Es lässt sich vermuten, dass der durch OXP ausgelöste oxidative Stress weder so ausgeprägt noch so rasch eintritt wie bei BLM. Obwohl OXP ebenfalls ROS generiert, geschieht dies auf indirektere und weniger O_2 -abhängige Weise, was den Unterschied in der Tumorreaktion erklären könnte (CHEN und STUBBE, 2005; RAYMOND et al., 1998). Diese Unterschiede könnten die vergleichsweise geringeren Auswirkungen sowohl auf die Tumoroxygenierung als auch auf die HbT-Werte erklären und legen nahe, dass die Wirkmechanismen von platinbasierten Chemotherapeutika und BLM in Bezug auf die vaskuläre Dynamik und die Tumorumgebung grundlegend unterschiedlich sind.

BVZ, ein anti-angiogener Wirkstoff, hemmt die Neubildung von Blutgefäßen und stabilisiert bestehende, häufig durchlässige Gefäße. Dies führt zu einer Reduktion des Tumorblutflusses, da die Gefäße weniger durchlässig und der Blutstrom eingeschränkt werden (FERRARA et al., 2004). Diese Unterbrechung der Blutversorgung resultiert in einer verminderten Zufuhr von O_2 und Hb zum Tumorgewebe, was wiederum den hypoxischen Zustand des Tumors verstärkt (JAIN, 2005). In Kombination mit OXP entfaltet BVZ einen synergistischen Effekt, indem es die abnormalen Blutgefäße des Tumors teilweise normalisiert, was zu einer effizienteren, jedoch weiterhin eingeschränkten O_2 -Versorgung führt

(GIANTONIO et al., 2007). Diese Kombination bewirkt nicht nur eine Hypoxie, sondern kann auch die zytotoxischen Effekte von OXP steigern.

Forschungsergebnisse legen nahe, dass Tumore unter hypoxischen Bedingungen empfindlicher gegenüber bestimmten Chemotherapeutika werden können, die oxidativen Stress induzieren, wie beispielsweise OXP. Hypoxie kann das Tumorgewebe anfälliger für DNA-Schäden und den daraus resultierenden Zelltod machen, wodurch die Effektivität der Therapie erhöht wird (WOUTERS und KORITZINSKY, 2008). Dies zeigt, wie wichtig das Zusammenspiel zwischen den vaskulären Effekten und der Chemotherapie für den Therapieerfolg ist.

Die OXP/BVZ-Gruppe wies im Vergleich zur OXP-Monotherapie eine deutlich stärkere Reduktion der SO_2 - und HbT-Werte im Tumor auf. Ein statistisch signifikanter Unterschied in den SO_2 -Werten nach der Behandlung konnte zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden, wobei der p-Wert 0,043 betrug. Trotz der stärkeren Reduktion der SO_2 - und HbT-Werte in der OXP/BVZ-Gruppe im Vergleich zur Monotherapie mit OXP waren die Effekte in Bezug auf die Tumoroxygenierung und -perfusion nicht so ausgeprägt wie die dokumentierten Wirkungen von BLM.

Dies lässt sich, wie bereits erwähnt, durch den O_2 -abhängigen, ROS-gesteuerten Mechanismus von BLM und dessen direkte Schädigung der Tumorblutgefäße erklären. Nach der Verabreichung von BVZ wird die Gefäßstruktur innerhalb von Tumoren morphologisch verbessert, was zur Reduktion der Hypoxie und des interstitiellen Flüssigkeitsdrucks führt. Ellis, L. M. beschrieb diesen Prozess als "vasculature normalization", der die Eindringung von Chemotherapeutika in das Tumorgewebe erleichtert und somit die therapeutische Wirksamkeit erhöht (ELLIS, 2006). Darüber hinaus konnte in einer Phase-II-Studie gezeigt werden, dass Patienten mit nicht-resezierbaren Lebermetastasen von einer neoadjuvanten Chemotherapie, bestehend aus BVZ in Kombination mit Capecitabin und OXP (XELOX), profitieren. Eine vielversprechende Konversionsrate von 42,2% zu einem resezierbaren Zustand wurde erreicht, was die potenzielle Wirksamkeit der Kombinationstherapie mit dem VEGF-Inhibitor BVZ unterstreicht (CHEN et al., 2018).

Diese Ergebnisse verdeutlichen den synergistischen Effekt von BVZ, das durch die Normalisierung der Tumolvaskulatur nicht nur die Verteilung von OXP verbessert, sondern auch den hypoxischen Zustand des Tumors verstärkt, wodurch die Sensibilität des Tumors gegenüber der Chemotherapie erhöht wird. Dieser komplexe Mechanismus, der auf die Wechselwirkungen zwischen BVZ und OXP zurückzuführen ist, hebt die Bedeutung der Kombinationstherapie in der Behandlung von metastasierten Tumoren hervor.

5.3 Interpretation der Angiogenese

Übereinstimmend mit der Reduktion der HbT-Werte im Tumorgewebe nach ECT in den BLM- und OXP/BVZ-Gruppen zeigte die immunhistochemische Analyse der CD31-positiven Mikrogefäße, dass die Angiogenese in diesen Gruppen wesentlich vermindert war als in der Gruppe, die ausschließlich mit

OXP behandelt wurde. Die durch OXP induzierte Bildung von ROS führt zu einem Anstieg des VEGF-A-Spiegels, welcher wiederum eine verstärkte Fenestration des sinusoidalen Endothels bewirkt (KOPETZ et al., 2009; MAY et al., 2011; OVERMAN et al., 2010; YOKOMORI et al., 2003). Diese strukturellen Veränderungen können zu endothelialen Mikrodissektionen und regionalen vaskulären Obstruktionen führen, was ein charakteristisches Merkmal der HSI darstellt (MAY et al., 2011; OVERMAN et al., 2010; YOKOMORI et al., 2003). Diese durch OXP ausgelösten Endothelläsionen sowie die Erhöhung der vaskulären Permeabilität könnten eine pro-angiogene Reaktion stimulieren, was die vermehrte CD31-Positivität in der OXP-Gruppe erklärt. Die geringere CD31-Expression in den BLM- und OXP/BVZ-Gruppen könnte auf eine effektivere Hemmung der Tumorangio-genese durch die vaskulären Effekte der ECT sowie durch die anti-angiogenen Eigenschaften von BVZ zurückzuführen sein. Diese Beobachtungen verdeutlichen die unterschiedlichen Mechanismen der Tumorgefäßschädigung zwischen den verschiedenen Therapieansätzen und ihre Auswirkungen auf die Neovaskularisation des Tumors.

Die HSI stellt eine bekannte Toxizität von OXP dar und manifestiert sich klinisch durch Splenomegalie, die durch einen erhöhten portalen Venendruck hervorgerufen werden kann (KANDUTSCH et al., 2008; OVERMAN et al., 2010). Diese pathophysiologischen Veränderungen führen wiederum zu einer persistierenden Thrombozytopenie, was das Risiko von Blutungen bei Patienten mit mKRK erhöht, die sich aufgrund der portalen Hypertension einer Leberresektion unterziehen müssen (ALOIA et al., 2006; KANDUTSCH et al., 2008; OVERMAN et al., 2010). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, haben Studien gezeigt, dass die zusätzliche Gabe von BVZ die Inzidenz einer leichten bis moderaten Thrombozytopenie im Rahmen von Behandlungen mit 5-FU und OXP reduzieren könnte (OVERMAN et al., 2018a). Diese Schutzwirkung wird darauf zurückgeführt, dass BVZ die durch OXP induzierte HSI sowie die damit einhergehende Splenomegalie abschwächen könnte, was zu einer Reduktion des portalen Venendrucks führt und somit die Entstehung einer Thrombozytopenie verringert.

5.4 Allgemeiner Gesundheitszustand der Tiere

In der vorliegenden Studie erwies sich die ECT in Kombination mit den drei Behandlungsansätzen als sichere und gut verträgliche Methode, ohne dass während der postinterventionellen Phase unerwünschte Ereignisse auftraten. Während der Experimente konnten keine signifikanten Unterschiede oder Reduktionen des KGs sowie des allgemeinen Gesundheitszustands der behandelten Tiere festgestellt werden. Die Entzündungsmarker lagen nach der Behandlung innerhalb der normalen Referenzwerte, was mit den Ergebnissen anderer experimenteller Studien übereinstimmt (ZMUC et al., 2019).

Zusätzlich wurde festgestellt, dass trotz der Insertion der Nadelelektrode in das hepatische Parenchym während und nach der Intervention keine Blutungskomplikationen auftraten. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der Blutzellanalyse überein, die zeigte, dass die Werte für Hb, HKT und die Anzahl der roten Blutkörperchen in allen behandelten Gruppen vergleichbar waren. Das Fehlen von Blutungen

kann auf die vorübergehende lokale Hypoperfusion sowie die Elektrokoagulation an der Injektionsstelle der Nadel zurückgeführt werden, die durch den hochintensiven Strom an der Nadeloberfläche verursacht wird. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ECT in diesem Kontext nicht nur sicher, sondern auch mit minimalen Komplikationen verbunden ist.

5.5 Limitationen der Arbeit

Obwohl diese Dissertation wertvolle Erkenntnisse zur Wirksamkeit der ECT bei KRLM liefert, müssen einige Limitationen in Betracht gezogen werden.

Erstens wurde die Untersuchung ausschließlich an einem Tiermodell durchgeführt, das zwar wichtige Informationen über die Effekte und Mechanismen der ECT bereitstellt, jedoch die komplexen biologischen Prozesse des menschlichen Organismus nur begrenzt widerspiegelt. Insbesondere die physiologischen Unterschiede zwischen dem Rattenmodell und dem menschlichen Patienten könnten zu abweichenden Ergebnissen in der klinischen Praxis führen. Aus diesem Grund ist die Übertragbarkeit der vorliegenden Daten auf den Menschen nur bedingt möglich. Zukünftige Studien sind daher erforderlich, um die Relevanz dieser Erkenntnisse im klinischen Kontext zu validieren und die potenzielle Anwendung der ECT bei Patienten mit KRLM weiter zu erforschen.

Die alleinige Verwendung von OXP kann insbesondere bei niedrigeren Dosierungen zur Entwicklung einer Resistenz in kolorektalen Krebszellen führen, wie bereits in früheren Studien beobachtet wurde (MARTIN et al., 2008). Höhere Dosierungen von OXP hingegen bergen das Risiko, sowohl gesundes als auch tumoröses Gewebe zu schädigen, was eine erhöhte Toxizität zur Folge haben könnte. Der Einsatz von Kombinationstherapien, wie FOLFOX oder FOLFIRI, könnte nicht nur der Resistenzentwicklung entgegenwirken, sondern auch die systemische Toxizität verringern. Dies legt nahe, dass der potenzielle Nutzen solcher Therapieregime in zukünftigen Studien weiter untersucht werden sollte (KOPETZ et al., 2009; MARTIN et al., 2008).

Ein weiterer begrenzender Faktor war die geringe Anzahl der Versuchstieren, die gemäß dem 3R-Prinzip (Replacement, Reduction, Refinement) eingesetzt wurde (RUSSELL et al., 1959). Obwohl dieser Ansatz ethisch gerechtfertigt ist, könnte die begrenzte Stichprobengröße die statistische Aussagekraft der Ergebnisse eingeschränkt haben. Eine größere Stichprobe hätte nicht nur die Aussagekraft erhöht, sondern auch differenziertere Analysen unerwünschter Ereignisse sowie der Langzeiteffekte der Behandlung ermöglicht. Die geringe Tieranzahl schränkt zudem die Verallgemeinerbarkeit der Ergebnisse ein und macht eine Replikation der Studie mit einer größeren Population erforderlich, um die Robustheit der Ergebnisse zu bestätigen.

Darüber hinaus wurde in dieser Studie ausschließlich die Behandlung von KRLM untersucht, was die Generalisierbarkeit der Ergebnisse einschränkt. Die Übertragbarkeit der Resultate auf Tumoren mit abweichender Pathophysiologie, wie beispielsweise HCC, ist begrenzt, da diese Tumoren unterschiedliche Vaskularisierungs- und Perfusionsmuster aufweisen. Diese Unterschiede könnten zu variierenden

Reaktionen auf die ECT in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika führen (EL JABBOUR et al., 2019). Zukünftige Studien sollten daher Tumoren mit unterschiedlicher biologischer Beschaffenheit in die Untersuchung einbeziehen, um die Anwendung der ECT auf weitere Tumorarten zu evaluieren und die allgemeine Übertragbarkeit der Ergebnisse zu prüfen.

Die Untersuchung potenzieller Langzeitfolgen der Behandlung, wie etwa die Rezidivrate des Tumors oder mögliche Langzeittoxizitäten, war in dieser Studie nicht möglich. Dies ist unter anderem auf die begrenzte Lebensspanne von Ratten zurückzuführen, welche keine langfristigen Beobachtungen zulässt. Da diese Aspekte jedoch von entscheidender Bedeutung für die Bewertung der klinischen Relevanz der Therapie sind, sollten sie in zukünftigen Studien Berücksichtigung finden, vorzugsweise unter Einsatz von Modellen, die eine längere Nachbeobachtungszeit ermöglichen.

5.6 Schlussfolgerung

In dieser Dissertation wurde die Wirksamkeit der ECT mit i.v. Verabreichung von BLM, OXP und der Kombination aus OXP und BVZ zur Behandlung von KRLM in einem Rattenmodell untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass BLM in Kombination mit ECT eine signifikant höhere Wirksamkeit in Bezug auf die Reduktion von Tumoroxygenierung, Tumorperfusion und Tumolvaskularisierung aufweist, verglichen mit den beiden OXP-basierten chemotherapeutischen Schemata.

Obwohl OXP in der Standardkombinationstherapie für KRK weit verbreitet ist, zeigte es in Kombination mit ECT eine geringere Wirksamkeit im Vergleich zu BLM. Die Zugabe von BVZ zu OXP führte zwar zu verbesserten Ergebnissen hinsichtlich der Reduktion der Tumoroxygenierung, Tumorperfusion und Tumorneovaskularisierung im Vergleich zur OXP-Monotherapie, dennoch zeigte sich BLM als überlegen. Diese Ergebnisse heben die potenziell höhere Effektivität von BLM in der ECT bei der Behandlung von KRLM im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen hervor.

Auf Basis dieser Erkenntnisse wäre es sinnvoll, künftige experimentelle Studien durchzuführen, die kombinierte Chemotherapieprotokolle wie FOLFOX, FOLFIRI oder FOLFOXIRI in Kombination mit ECT evaluieren, um die Wirksamkeit der leitlinienbasierten Therapien in Verbindung mit dieser Technologie zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden gezielt einzelne chemotherapeutische Substanzen eingesetzt, um deren spezifische Effekte sowie mögliche unerwünschte Ereignisse in Kombination mit ECT zu analysieren.

Zusammenfassend liefert diese Untersuchung wertvolle Informationen zur Anwendung der ECT bei hepatischen Metastasen des KRKs und hebt das Potenzial von BLM als besonders effektives Chemotherapeutikum hervor. Die Ergebnisse bilden die Grundlage für weiterführende Studien und die potenzielle Weiterentwicklung kombinierter Therapieansätze, um die klinische Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem KRK zu optimieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Adam R, de Gramont A, Figueras J, Kokudo N, Kunstlinger F, Loyer E, Poston G, Rougier P, Rubbia-Brandt L, Sobrero A, Teh C, Tejpar S, Van Cutsem E, Vauthey JN, Páhlman L (2015) Managing synchronous liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. *Cancer Treat Rev* 41:729-741
2. Adam R, Imai K, Castro Benitez C, Allard MA, Vibert E, Sa Cunha A, Cherqui D, Baba H, Castaing D (2016) Outcome after associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy and conventional two-stage hepatectomy for colorectal liver metastases. *Br J Surg* 103:1521-1529
3. Adson MA, Van Heerden JA (1980) Major hepatic resections for metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* 191:576-583
4. Ahmad S (2010) Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodivers* 7:543-566
5. Allen PJ, Kemeny N, Jarnagin W, DeMatteo R, Blumgart L, Fong Y (2003) Importance of response to neoadjuvant chemotherapy in patients undergoing resection of synchronous colorectal liver metastases. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 7:109-117
6. Aloia T, Sebah M, Plasse M, Karam V, Lévi F, Giacchetti S, Azoulay D, Bismuth H, Castaing D, Adam R (2006) Liver histology and surgical outcomes after preoperative chemotherapy with fluorouracil plus oxaliplatin in colorectal cancer liver metastases. *J Clin Oncol* 24:4983-4990
7. Alonso S, Saltz L (2021) The Landmark Series: Chemotherapy for Non-Metastatic Colon Cancer. *Ann Surg Oncol* 28:995-1001
8. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, Meyer L, Gress DM, Byrd DR, Winchester DP (2017) The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 67:93-99
9. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A (2004) Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350:2343-2351
10. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F, de Gramont A (2009) Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 27:3109-3116
11. André T, de Gramont A, Vernerey D, Chibaudel B, Bonnetain F, Tijeras-Raballand A, Scriver A, Hickish T, Tabernero J, Van Laethem JL, Banzi M, Maartense E, Shmueli E, Carlsson GU,

- Scheithauer W, Papamichael D, Möehler M, Landolfi S, Demetter P, Colote S, Tournigand C, Louvet C, Duval A, Fléjou JF, de Gramont A (2015) Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J Clin Oncol* 33:4176-4187
12. André T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, Smith D, Garcia-Carbonero R, Benavides M, Gibbs P, de la Fouchardiere C, Rivera F, Elez E, Bendell J, Le DT, Yoshino T, Van Cutsem E, Yang P, Farooqui MZH, Marinello P, Diaz LA, Jr. (2020) Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 383:2207-2218
 13. Andreou A, Gloor S, Inglin J, Martinelli CDP, Banz V, Lachenmayer A, Kim-Fuchs C, Candinas D, Beldi G (2021) Parenchymal-sparing hepatectomy for colorectal liver metastases reduces postoperative morbidity while maintaining equivalent oncologic outcomes compared to non-parenchymal-sparing resection. *Surgical oncology* 38:101631
 14. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Arañes MJ, Nicholas C, Lesser M, Mariadason JM, Augenlicht LH (2004) Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 91:1931-1946
 15. Arasanz H, Gato-Cañas M, Zuazo M, Ibañez-Vea M, Breckpot K, Kochan G, Escors D (2017) PD1 signal transduction pathways in T cells. *Oncotarget* 8:51936
 16. Baidoun F, Elshiwly K, Elkeraie Y, Merjaneh Z, Khoudari G, Sarmini MT, Gad M, Al-Husseini M, Saad A (2021) Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. *Curr Drug Targets* 22:998-1009
 17. Baxter NN, Kennedy EB, Bergsland E, Berlin J, George TJ, Gill S, Gold PJ, Hantel A, Jones L, Lieu C, Mahmoud N, Morris AM, Ruiz-Garcia E, You YN, Meyerhardt JA (2022) Adjuvant Therapy for Stage II Colon Cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol* 40:892-910
 18. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen Y-J, Ciombor KK, Cohen S, Cooper HS, Deming D, Farkas L (2021) Colon cancer, version 2.2021, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 19:329-359
 19. Bertino G, Sersa G, De Terlizzi F, Occhini A, Plaschke CC, Groselj A, Langdon C, Grau JJ, McCaul JA, Heuveling D (2016) European Research on Electrochemotherapy in Head and Neck Cancer (EURECA) project: Results of the treatment of skin cancer. *European Journal of Cancer* 63:41-52
 20. Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, Lenz HJ, Heinemann V, Klinkhardt U, Beier F, Duecker K, van Krieken JH, Tejpar S (2015) FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 51:1243-1252

21. Bonney GK, Chew CA, Lodge P, Hubbard J, Halazun KJ, Trunecka P, Muiesan P, Mirza DF, Isaac J, Laing RW (2021) Liver transplantation for non-resectable colorectal liver metastases: the International Hepato-Pancreato-Biliary Association consensus guidelines. *The lancet Gastroenterology & hepatology* 6:933-946
22. Bosnjak M, Jesenko T, Markelc B, Janzic L, Cemazar M, Sersa G (2021) PARP inhibitor olaparib has a potential to increase the effectiveness of electrochemotherapy in BRCA1 mutated breast cancer in mice. *Bioelectrochemistry* 140:107832
23. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, Jemal A (2024) Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 74:229-263
24. Brenner H, Chen C (2018) The colorectal cancer epidemic: challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention. *Br J Cancer* 119:785-792
25. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C (2017) *TNM classification of malignant tumours*, John Wiley & Sons).
26. Bromham N, Kallioinen M, Hoskin P, Davies RJ (2020) Colorectal cancer: summary of NICE guidance. *Bmj* 368
27. Byrne MM, Chávez-Villa M, Ruffolo LI, Loria A, Endo Y, Niewiowski A, Jimenez-Soto C, Melaragno JJ, Ramaraju GA, Farooq PD, Dunne RF, Pineda-Solis K, Nair A, Orloff M, Tomiyama K, Hernandez-Alejandro R (2025) The Rochester Protocol for living donor liver transplantation of unresectable colorectal liver metastasis: A 5-year report on selection, approval, and outcomes. *Am J Transplant* 25:780-792
28. Cassidy J (2000) Review of oxaliplatin: an active platinum agent in colorectal cancer. *Int J Clin Pract* 54:399-402
29. Chan AC, Cheung TT, Fan ST, Chok KS, Chan SC, Poon RT, Lo CM (2013) Survival analysis of high-intensity focused ultrasound therapy versus radiofrequency ablation in the treatment of recurrent hepatocellular carcinoma. *Annals of surgery* 257:686-692
30. Charnsangavej C, Clary B, Fong Y, Grothey A, Pawlik TM, Choti MA (2006) Selection of patients for resection of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. *Annals of surgical oncology* 13:1261-1268
31. Chavez MI, Coon C, Gamblin TC (2020). Ablative Techniques for CRLM: Alone or in Association. In *Colorectal Cancer Liver Metastases: A Comprehensive Guide to Management*, Correia MM, MA Choti, FG Rocha, G Wakabayashi, eds. (Cham, Springer International Publishing), pp. 487-506.

32. Chen HH, Lin JK, Chen JB, Chuang CH, Liu MC, Wang JY, Changchien CR (2018) Neoadjuvant therapy of bevacizumab in combination with oxaliplatin and capecitabine (XELOX) for patients with metastatic colorectal cancer with unresectable liver metastases: a phase II, open-label, single-arm, noncomparative trial. *Asia Pac J Clin Oncol* 14:61-68
33. Chen J, Stubbe J (2005) Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5:102-112
34. Chibaudel B, Tournigand C, André T, de Gramont A (2012) Therapeutic strategy in unresectable metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol* 4:75-89
35. Cho YK, Kim JK, Kim WT, Chung JW (2010) Hepatic resection versus radiofrequency ablation for very early stage hepatocellular carcinoma: a Markov model analysis. *Hepatology* 51:1284-1290
36. Chong G, Cunningham D (2005) Improving long-term outcomes for patients with liver metastases from colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23:9063-9066
37. Chow FC, Chok KS (2019) Colorectal liver metastases: An update on multidisciplinary approach. *World J Hepatol* 11:150-172
38. Ciliberto D, Staropoli N, Caglioti F, Chiellino S, Ierardi A, Ingargiola R, Botta C, Arbitrio M, Correale P, Tassone P, Tagliaferri P (2018) The best strategy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer patients in first-line treatment: A classic and Bayesian meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 125:69-77
39. Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF (1997) The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR Journal* 38:41-48
40. Coletti L, Battaglia V, De Simone P, Turturici L, Bartolozzi C, Filipponi F (2017) Safety and feasibility of electrochemotherapy in patients with unresectable colorectal liver metastases: A pilot study. *Int J Surg* 44:26-32
41. Condello M, D'Avack G, Vona R, Spugnini EP, Scacco L, Meschini S (2021) Electrochemotherapy with mitomycin C potentiates apoptosis death by inhibiting autophagy in squamous carcinoma cells. *Cancers* 13:3867
42. Condello M, D'Avack G, Spugnini EP, Meschini S (2022) Electrochemotherapy: An Alternative Strategy for Improving Therapy in Drug-Resistant SOLID Tumors. *Cancers* 14:4341
43. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, Mezi S, Tomasello G, Ronzoni M, Zaniboni A, Tonini G, Carlomagno C, Allegrini G, Chiara S, D'Amico M, Granetto C, Cazzaniga M, Boni L, Fontanini G, Falcone A (2015) FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol* 16:1306-1315

44. Cucchetti A, Piscaglia F, Cescon M, Colecchia A, Ercolani G, Bolondi L, Pinna AD (2013) Cost-effectiveness of hepatic resection versus percutaneous radiofrequency ablation for early hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 59:300-307
45. De Baere T, Deschamps F (2014) New tumor ablation techniques for cancer treatment (microwave, electroporation). *Diagnostic and interventional imaging* 95:677-682
46. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A (2000) Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18:2938-2947
47. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A (2023) Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 41:5080-5089
48. de Santibañes E, Clavien PA (2012) Playing Play-Doh to prevent postoperative liver failure: the "ALPPS" approach. *Ann Surg* 255:415-417
49. Deng G, Li H, Jia Gq, Fang D, Tang Yy, Xie J, Chen Kf, Chen Zy (2019) Parenchymal-sparing versus extended hepatectomy for colorectal liver metastases: A systematic review and meta-analysis. *Cancer medicine* 8:6165-6175
50. Diaz LA, Jr., Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, Smith D, Garcia-Carbonero R, Benavides M, Gibbs P, de la Fourchardiere C, Rivera F, Elez E, Le DT, Yoshino T, Zhong WY, Fogelman D, Marinello P, Andre T (2022) Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer (KEYNOTE-177): final analysis of a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol* 23:659-670
51. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P (2000) Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355:1041-1047
52. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocákova I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wizezorek J, Sidhu R, Patterson SD (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 369:1023-1034
53. Dueland S, Yaqub S, Syversveen T, Carling U, Hagness M, Brudvik KW, Line P-D (2021) Survival outcomes after portal vein embolization and liver resection compared with liver

- transplant for patients with extensive colorectal cancer liver metastases. *JAMA surgery* 156:550-557
54. Dupre A, Melodelima D, Perol D, Chen Y, Vincenot J, Chapelon J-Y, Rivoire M (2015) First clinical experience of intra-operative high intensity focused ultrasound in patients with colorectal liver metastases: a phase I-IIa study. *PloS one* 10:e0118212
 55. Eastman A (1987) The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther* 34:155-166
 56. Edhemovic I, Gadzije EM, Breclj E, Miklavcic D, Kos B, Zupanic A, Mali B, Jarm T, Pavliha D, Marcan M, Gasljevic G, Gorjup V, Music M, Vavpotic TP, Cemazar M, Snoj M, Sersa G (2011) Electrochemotherapy: A New Technological Approach in Treatment of Metastases in the Liver. *Technology in Cancer Research & Treatment* 10:475-485
 57. Edhemovic I, Breclj E, Gasljevic G, Marolt Music M, Gorjup V, Mali B, Jarm T, Kos B, Pavliha D, Grcar Kuzmanov B, Cemazar M, Snoj M, Miklavcic D, Gadzije EM, Sersa G (2014) Intraoperative electrochemotherapy of colorectal liver metastases. *J Surg Oncol* 110:320-327
 58. El Jabbour T, Lagana SM, Lee H (2019) Update on hepatocellular carcinoma: Pathologists' review. *World J Gastroenterol* 25:1653-1665
 59. Elferink MA, de Jong KP, Klaase JM, Siemerink EJ, de Wilt JH (2015) Metachronous metastases from colorectal cancer: a population-based study in North-East Netherlands. *Int J Colorectal Dis* 30:205-212
 60. Ellis LM (2006) Mechanisms of action of bevacizumab as a component of therapy for metastatic colorectal cancer. *Semin Oncol* 33:S1-7
 61. Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, Jonas E, Freedman J (2018) Colorectal cancer liver metastases - a population-based study on incidence, management and survival. *BMC Cancer* 18:78
 62. Enokida T, Tahara M (2021) Electrochemotherapy in the treatment of head and neck cancer: current conditions and future directions. *Cancers* 13:1418
 63. Evrard S, Torzilli G, Caballero C, Bonhomme B (2018) Parenchymal sparing surgery brings treatment of colorectal liver metastases into the precision medicine era. *Eur J Cancer* 104:195-200
 64. Facciorusso A, Serviddio G, Muscatiello N (2016) Local ablative treatments for hepatocellular carcinoma: An updated review. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics* 7:477
 65. Faivre S, Chan D, Salinas R, Woynarowska B, Woynarowski JM (2003) DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 66:225-237

66. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136:E359-386
67. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3:391-400
68. Fischel JL, Formento P, Ciccolini J, Rostagno P, Etienne MC, Catalin J, Milano G (2002) Impact of the oxaliplatin-5 fluorouracil-folinic acid combination on respective intracellular determinants of drug activity. *Br J Cancer* 86:1162-1168
69. Frühling P, Strömberg C, Isaksson B, Urdzik J (2023) A comparison of the simultaneous, liver-first, and colorectal-first strategies for surgical treatment of synchronous colorectal liver metastases at two major liver-surgery institutions in Sweden. *HPB (Oxford)* 25:26-36
70. Gäbelein G, Glanemann M (2019) Synchrone kolorektale Lebermetastasen – kurative Konzepte. *Zentralbl Chir* 144:433-436
71. Gage AA, Baust J (1998) Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology* 37:171-186
72. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul J-L, Schirmacher P, Vilgrain V (2018) EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 69:182-236
73. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Boya P, Brenner C, Campanella M, Candi E, Carmona-Gutierrez D, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, Conrad M, Cubillos-Ruiz JR, Czabotar PE, D'Angiolella V, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, DeBerardinis RJ, Deshmukh M, Di Daniele N, Di Virgilio F, Dixit VM, Dixon SJ, Duckett CS, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Elrod JW, Fimia GM, Fulda S, García-Sánchez AJ, Garg AD, Garrido C, Gavathiotis E, Golstein P, Gottlieb E, Green DR, Greene LA, Gronemeyer H, Gross A, Hajnoczky G, Hardwick JM, Harris IS, Hengartner MO, Hetz C, Ichijo H, Jäättelä M, Joseph B, Jost PJ, Juin PP, Kaiser WJ, Karin M, Kaufmann T, Kepp O, Kimchi A, Kitis RN, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lee SW, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, López-Otín C, Lowe SW, Luedde T, Lugli E, MacFarlane M, Madeo F, Malewicz M, Malorni W, Manic G, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Mehlen P, Meier P, Melino S, Miao EA, Molkentin JD, Moll UM, Muñoz-Pinedo C, Nagata S, Nuñez G, Oberst A, Oren M, Overholtzer M, Pagano M, Panaretakis T, Pasparakis M, Penninger JM, Pereira DM, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JHM, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rehm M, Rizzuto R, Rodrigues CMP, Rubinsztein DC, Rudel T, Ryan KM, Sayan E,

- Scorrano L, Shao F, Shi Y, Silke J, Simon HU, Sistigu A, Stockwell BR, Strasser A, Szabadkai G, Tait SWG, Tang D, Tavernarakis N, Thorburn A, Tsujimoto Y, Turk B, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Vander Heiden MG, Villunger A, Virgin HW, Vousden KH, Vucic D, Wagner EF, Walczak H, Wallach D, Wang Y, Wells JA, Wood W, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Zitvogel L, Melino G, Kroemer G (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 25:486-541
74. Garrean S, Hering J, Helton WS, Espat NJ (2007) A primer on transarterial, chemical, and thermal ablative therapies for hepatic tumors. *The American journal of surgery* 194:79-88
75. Geboers B, Scheffer HJ, Graybill PM, Ruarus AH, Nieuwenhuizen S, Puijk RS, van den Tol PM, Davalos RV, Rubinsky B, de Gruijl TD (2020) High-voltage electrical pulses in oncology: irreversible electroporation, electrochemotherapy, gene electrotransfer, electrofusion, and electroimmunotherapy. *Radiology* 295:254-272
76. Gehl J (2003) Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scandinavica* 177:437-447
77. Gehl J, Sersa G, Matthiessen LW, Muir T, Soden D, Occhini A, Quaglino P, Curatolo P, Campana LG, Kunte C, Clover AJP, Bertino G, Farricha V, Odili J, Dahlstrom K, Benazzo M, Mir LM (2018) Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. *Acta Oncol* 57:874-882
78. Gervais DA, Arellano RS (2011) Percutaneous tumor ablation for hepatocellular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 197:789-794
79. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB, 3rd (2007) Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 25:1539-1544
80. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB, 3rd (2023) Bevacizumab in Combination With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin (FOLFOX4) for Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer: Results From the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 41:3670-3675
81. Gillams A, Goldberg N, Ahmed M, Bale R, Breen D, Callstrom M, Chen MH, Choi BI, de Baere T, Dupuy D (2015) Thermal ablation of colorectal liver metastases: a position paper by an international panel of ablation experts, The Interventional Oncology Sans Frontières meeting 2013. *European radiology* 25:3438-3454
82. Gissel H, Lee RC, Gehl J (2011) Electroporation and cellular physiology. *Clinical aspects of electroporation*:9-17

83. Glassberg MB, Ghosh S, Clymer JW, Wright GWJ, Ferko N, Amaral JF (2019) Microwave ablation compared with hepatic resection for the treatment of hepatocellular carcinoma and liver metastases: a systematic review and meta-analysis. *World J Surg Oncol* 17:98
84. Gmeiner WH (2024) Recent Advances in Therapeutic Strategies to Improve Colorectal Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* 16
85. González HD, Figueras J (2007) Practical questions in liver metastases of colorectal cancer: general principles of treatment. *HPB* 9:251-258
86. Gourdier I, Del Rio M, Crabbé L, Candeil L, Copois V, Ychou M, Auffray C, Martineau P, Mechti N, Pommier Y, Pau B (2002) Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett* 529:232-236
87. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E (2000) Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res* 6:1205-1218
88. Greenlee JD, Lopez-Cavestany M, Ortiz-Otero N, Liu K, Subramanian T, Cagir B, King MR (2021) Oxaliplatin resistance in colorectal cancer enhances TRAIL sensitivity via death receptor 4 upregulation and lipid raft localization. *Elife* 10
89. Grivennikov SI (2013) Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol* 35:229-244
90. Grothey A, Sobrero AF, Shields AF, Yoshino T, Paul J, Taieb J, Souglakos J, Shi Q, Kerr R, Labianca R, Meyerhardt JA, Vernerey D, Yamanaka T, Boukovinas I, Meyers JP, Renfro LA, Niedzwiecki D, Watanabe T, Torri V, Saunders M, Sargent DJ, Andre T, Iveson T (2018) Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *N Engl J Med* 378:1177-1188
91. Gyde SN, Prior P, Allan RN, Stevens A, Jewell DP, Truelove SC, Lofberg R, Brostrom O, Hellers G (1988) Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centres. *Gut* 29:206-217
92. Haemmerich D, Schutt DJ (2010) RF ablation at low frequencies for targeted tumor heating: In vitro and computational modeling results. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 58:404-410
93. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, O'Rourke MA, Frontiera MS, Jackson DV, Mayer RJ (2005) Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J Clin Oncol* 23:8671-8678
94. Hamilton SR, Bosman F, Boffetta P, Ilyas M, Morreau H, Nakamura SI (2010) Carcinoma of the colon and rectum. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*:138-139

95. Hayward RL, Macpherson JS, Cummings J, Monia BP, Smyth JF, Jodrell DI (2004) Enhanced oxaliplatin-induced apoptosis following antisense Bcl-xl down-regulation is p53 and Bax dependent: Genetic evidence for specificity of the antisense effect. *Mol Cancer Ther* 3:169-178
96. Herrinton LJ, Liu L, Levin TR, Allison JE, Lewis JD, Velayos F (2012) Incidence and mortality of colorectal adenocarcinoma in persons with inflammatory bowel disease from 1998 to 2010. *Gastroenterology* 143:382-389
97. Holleczeck B, Rossi S, Domenic A, Innos K, Minicozzi P, Francisci S, Hackl M, Eisemann N, Brenner H (2015) On-going improvement and persistent differences in the survival for patients with colon and rectum cancer across Europe 1999-2007 - Results from the EURO CARE-5 study. *Eur J Cancer* 51:2158-2168
98. Ibrahim A, Hirschfeld S, Cohen MH, Griebel DJ, Williams GA, Pazdur R (2004) FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *Oncologist* 9:8-12
99. Ivey GD, Johnston FM, Azad NS, Christenson ES, Lafaro KJ, Shubert CR (2022) Current Surgical Management Strategies for Colorectal Cancer Liver Metastases. *Cancers (Basel)* 14
100. Jain RK (2005) Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts. *Oncology (Williston Park)* 19:7-16
101. Jemal A, Ward EM, Johnson CJ, Cronin KA, Ma J, Ryerson B, Mariotto A, Lake AJ, Wilson R, Sherman RL, Anderson RN, Henley SJ, Kohler BA, Penberthy L, Feuer EJ, Weir HK (2017) Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. *J Natl Cancer Inst* 109
102. Jing X, Yang F, Shao C, Wei K, Xie M, Shen H, Shu Y (2019) Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular Cancer* 18:157
103. Jung SE, Cho SH, Jang JH, Han J-Y (2011) High-intensity focused ultrasound ablation in hepatic and pancreatic cancer: complications. *Abdominal imaging* 36:185-195
104. Kaczirek K (2017) ASCO 2016—update colorectal liver metastases. *memo-Magazine of European Medical Oncology* 10:103-105
105. Kandutsch S, Klinger M, Hacker S, Wrba F, Gruenberger B, Gruenberger T (2008) Patterns of hepatotoxicity after chemotherapy for colorectal cancer liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 34:1231-1236
106. Kauffels A, Kitzmüller M, Gruber A, Nowack H, Bohnenberger H, Spitzner M, Kuthning A, Sprenger T, Czejka M, Ghadimi M, Sperling J (2019) Hepatic arterial infusion of irinotecan and EmboCept(®) S results in high tumor concentration of SN-38 in a rat model of colorectal liver metastases. *Clin Exp Metastasis* 36:57-66

107. Kim Y-s, Rhim H, Choi MJ, Lim HK, Choi D (2008) High-intensity focused ultrasound therapy: an overview for radiologists. *Korean journal of radiology* 9:291-302
108. Knavel EM, Brace CL (2013) Tumor ablation: common modalities and general practices. *Techniques in vascular and interventional radiology* 16:192-200
109. Koch-Institut R, e.V. GdeKiD (2019) Krebs in Deutschland 2015/2016.
110. Koethe Y, Wilson N, Narayanan G (2022) Irreversible electroporation for colorectal cancer liver metastasis: a review. *Int J Hyperthermia* 39:682-687
111. Kooby DA, Stockman J, Ben-Porat L, Gonen M, Jarnagin WR, Dematteo RP, Tuorto S, Wuest D, Blumgart LH, Fong Y (2003) Influence of transfusions on perioperative and long-term outcome in patients following hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 237:860-869; discussion 869-870
112. Kopetz S, Lesslie DP, Dallas NA, Park SI, Johnson M, Parikh NU, Kim MP, Abbruzzese JL, Ellis LM, Chandra J, Gallick GE (2009) Synergistic activity of the SRC family kinase inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer Res* 69:3842-3849
113. Kosiek O, Strach K, Ricke J, Pech M (2012) [Irreversible electroporation - a new kid on the block?]. *Radiologe* 52:38-43
114. Krul MF, Gerritsen SL, Vissers FL, Klompenhouwer EG, Ruers TJ, Kuhlmann KF, Kok NF (2022) Radiofrequency versus microwave ablation for intraoperative treatment of colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 48:834-840
115. Łapińska Z, Dębiński M, Szewczyk A, Choromańska A, Kulbacka J, Saczko J (2020) Electrochemotherapy with calcium chloride and 17 β -estradiol modulated viability and apoptosis pathway in human ovarian cancer. *Pharmaceutics* 13:19
116. Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, Wieand HS, Leigh JE, Rubin J, McCormack GW, Gerstner JB, Krook JE, Malliard J, et al. (1989) Surgical adjuvant therapy of large-bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. The North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J Clin Oncol* 7:1447-1456
117. Li J-J, Xu G-L, Gu M-F, Luo G-Y, Rong Z, Wu P-H, Xia J-C (2007) Complications of high intensity focused ultrasound in patients with recurrent and metastatic abdominal tumors. *World journal of gastroenterology: WJG* 13:2747
118. Lynch D, Murphy A (2016) The emerging role of immunotherapy in colorectal cancer. *Annals of translational medicine* 4

119. Majumdar A, Roccarina D, Thorburn D, Davidson BR, Tsochatzis E, Gurusamy KS (2017) Management of people with early- or very early-stage hepatocellular carcinoma: an attempted network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev* 3:Cd011650
120. Makuku R, Khalili N, Razi S, Keshavarz-Fathi M, Rezaei N (2021) Current and future perspectives of PD-1/PDL-1 blockade in cancer immunotherapy. *Journal of Immunology Research* 2021:6661406
121. Mallidi S, Watanabe K, Timerman D, Schoenfeld D, Hasan T (2015) Prediction of tumor recurrence and therapy monitoring using ultrasound-guided photoacoustic imaging. *Theranostics* 5:289-301
122. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM (2006) Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 244:254-259
123. Mann CD, Metcalfe MS, Lloyd DM, Maddern GJ, Dennison AR (2010) The safety and efficacy of ablative techniques adjacent to the hepatic vasculature and biliary system. *ANZ J Surg* 80:41-49
124. Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, Roberts LR, Heimbach JK (2018) Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 68:723-750
125. Martin J, Petrillo A, Smyth EC, Shaida N, Khwaja S, Cheow HK, Duckworth A, Heister P, Praseedom R, Jah A, Balakrishnan A, Harper S, Liau S, Kosmoliaptsis V, Huguet E (2020) Colorectal liver metastases: Current management and future perspectives. *World J Clin Oncol* 11:761-808
126. Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ (2008) Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 14:1291-1295
127. Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J, Collins CG, Snoj M, Billard V, Geertsen PF, Larkin JO, Miklavcic D, Pavlovic I, Paulin-Kosir SM, Cemazar M, Morsli N, Soden DM, Rudolf Z, Robert C, O'Sullivan GC, Mir LM (2006) Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *European Journal of Cancer Supplements* 4:3-13
128. Marzo T, Ferraro G, Cucci LM, Pratesi A, Hansson Ö, Satriano C, Merlino A, La Mendola D (2022) Oxaliplatin inhibits angiogenic proliferative and cell migration effects in prostate cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 226:111657

129. May D, Djonov V, Zamir G, Bala M, Safadi R, Sklair-Levy M, Keshet E (2011) A transgenic model for conditional induction and rescue of portal hypertension reveals a role of VEGF-mediated regulation of sinusoidal fenestrations. *PLoS One* 6:e21478
130. Mentha G, Majno P, Andres A, Rubbia-Brandt L, Morel P, Roth A (2006) Neoadjuvant chemotherapy and resection of advanced synchronous liver metastases before treatment of the colorectal primary. *Journal of British Surgery* 93:872-878
131. Merlo S, Vivod G, Bebar S, Bošnjak M, Čemažar M, Serša G, Brezar SK, Kovačević N (2021) Literature review and our experience with bleomycin-based electrochemotherapy for cutaneous vulvar metastases from endometrial cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment* 20:15330338211010134
132. Meschini S, Condello M, Lista P, Vincenzi B, Baldi A, Citro G, Arancia G, Spugnini EP (2012) Electroporation adopting trains of biphasic pulses enhances in vitro and in vivo the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrug resistant colon adenocarcinoma cells (LoVo). *European Journal of Cancer* 48:2236-2243
133. Miklavčič D, Serša G, Breclj E, Gehl J, Soden D, Bianchi G, Ruggieri P, Rossi CR, Campana LG, Jarm T (2012) Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. *Med Biol Eng Comput* 50:1213-1225
134. Miklavčič D, Mali B, Kos B, Heller R, Serša G (2014) Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *Biomed Eng Online* 13:29
135. Mir L (2006) Bases and rationale of the electrochemotherapy. *Ejc Supplements - EJC SUPPL* 4:38-44
136. Mittal L, Aryal UK, Camarillo IG, Ferreira RM, Sundararajan R (2019) Quantitative proteomic analysis of enhanced cellular effects of electrochemotherapy with Cisplatin in triple-negative breast cancer cells. *Scientific reports* 9:13916
137. Mizobe T, Ogata Y, Murakami H, Akagi Y, Ishibashi N, Mori S, Sasatomi T, Shirouzu K (2008) Efficacy of the combined use of bevacizumab and irinotecan as a postoperative adjuvant chemotherapy in colon carcinoma. *Oncol Rep* 20:517-523
138. Moris D, Ronnekleiv-Kelly S, Rahnama-Azar AA, Felekouras E, Dillhoff M, Schmidt C, Pawlik TM (2017) Parenchymal-Sparing Versus Anatomic Liver Resection for Colorectal Liver Metastases: a Systematic Review. *J Gastrointest Surg* 21:1076-1085
139. Morris VK, Kennedy EB, Baxter NN, Benson AB, 3rd, Cercek A, Cho M, Ciombor KK, Cremolini C, Davis A, Deming DA, Fakhri MG, Gholami S, Hong TS, Jaiyesimi I, Klute K, Lieu C, Sanoff H, Strickler JH, White S, Willis JA, Eng C (2023) Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol* 41:678-700

140. Needles A, Heinmiller A, Sun J, Theodoropoulos C, Bates D, Hirson D, Yin M, Foster FS (2013) Development and initial application of a fully integrated photoacoustic micro-ultrasound system. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 60:888-897
141. Overman MJ, Maru DM, Charnsangavej C, Loyer EM, Wang H, Pathak P, Eng C, Hoff PM, Vauthey JN, Wolff RA, Kopetz S (2010) Oxaliplatin-mediated increase in spleen size as a biomarker for the development of hepatic sinusoidal injury. *J Clin Oncol* 28:2549-2555
142. Overman MJ, Ferrarotto R, Raghav K, George B, Qiao W, Machado KK, Saltz LB, Mazard T, Vauthey JN, Hoff PM, Hobbs B, Loyer EM, Kopetz S (2018a) The Addition of Bevacizumab to Oxaliplatin-Based Chemotherapy: Impact Upon Hepatic Sinusoidal Injury and Thrombocytopenia. *J Natl Cancer Inst* 110:888-894
143. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz H-J, Gelsomino F, Aglietta M, Morse MA, Van Cutsem E, McDermott R, Hill A (2018b) Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair–deficient/microsatellite instability–high metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology* 36:773-779
144. Pathak S, Jones R, Tang JM, Parmar C, Fenwick S, Malik H, Poston G (2011) Ablative therapies for colorectal liver metastases: a systematic review. *Colorectal Dis* 13:e252-265
145. Perrone AM, Ravegnini G, Miglietta S, Argnani L, Ferioli M, De Crescenzo E, Tesei M, Di Stanislao M, Girolimetti G, Gasparre G (2021) Electrochemotherapy in vulvar cancer and cisplatin combined with electroporation. systematic review and in vitro studies. *Cancers* 13:1993
146. Pestieau SR, Belliveau JF, Griffin H, Stuart OA, Sugarbaker PH (2001) Pharmacokinetics of intraperitoneal oxaliplatin: experimental studies. *J Surg Oncol* 76:106-114
147. Poulou LS, Botsa E, Thanou I, Ziakas PD, Thanos L (2015) Percutaneous microwave ablation vs radiofrequency ablation in the treatment of hepatocellular carcinoma. *World journal of hepatology* 7:1054
148. Probst U, Fuhrmann I, Beyer L, Wiggermann P (2018) Electrochemotherapy as a New Modality in Interventional Oncology: A Review. *Technol Cancer Res Treat* 17:1533033818785329
149. Puijk RS, Ruarus AH, Vroomen L, van Tilborg A, Scheffer HJ, Nielsen K, de Jong MC, de Vries JJJ, Zonderhuis BM, Eker HH, Kazemier G, Verheul H, van der Meijs BB, van Dam L, Sorgedragger N, Coupé VMH, van den Tol PMP, Meijerink MR (2018) Colorectal liver metastases: surgery versus thermal ablation (COLLISION) - a phase III single-blind prospective randomized controlled trial. *BMC Cancer* 18:821
150. Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E (1998) Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 9:1053-1071

151. Rich LJ, Seshadri M (2015) Photoacoustic imaging of vascular hemodynamics: validation with blood oxygenation level-dependent MR imaging. *Radiology* 275:110-118
152. Rocha FG, D'Angelica M (2010) Treatment of liver colorectal metastases: role of laparoscopy, radiofrequency ablation, and microwave coagulation. *J Surg Oncol* 102:968-974
153. Ruers T, Punt C, Van Coevorden F, Pierie J, Borel-Rinkes I, Ledermann J, Poston G, Bechstein W, Lentz M, Mauer M (2012) Radiofrequency ablation combined with systemic treatment versus systemic treatment alone in patients with non-resectable colorectal liver metastases: a randomized EORTC Intergroup phase II study (EORTC 40004). *Annals of Oncology* 23:2619-2626
154. Ruers T, Van Coevorden F, Punt CJA, Pierie J-PEN, Borel-Rinkes I, Ledermann JA, Poston G, Bechstein W, Lentz M-A, Mauer M, Folprecht G, Van Cutsem E, Ducreux M, Nordlinger B, Research EOf, Treatment of Cancer Gastro-Intestinal Tract Cancer Group ALutidCAO, Group tNCRICCS (2017) Local Treatment of Unresectable Colorectal Liver Metastases: Results of a Randomized Phase II Trial. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 109
155. Russell WMS, Burch RL, Hume CW (1959) *The principles of humane experimental technique*, Vol 238, Methuen London).
156. Ryan MJ, Willatt J, Majdalany BS, Kielar AZ, Chong S, Ruma JA, Pandya A (2016) Ablation techniques for primary and metastatic liver tumors. *World journal of hepatology* 8:191
157. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzén F, Cassidy J (2008) Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 26:2013-2019
158. Saltz LB (2009) Looking ahead: what will change in colorectal cancer treatment? *Gastrointestinal Cancer Research: GCR* 3:S16
159. Schadde E, Ardiles V, Slankamenac K, Tschuor C, Sergeant G, Amacker N, Baumgart J, Croome K, Hernandez-Alejandro R, Lang H, de Santibañes E, Clavien PA (2014) ALPPS offers a better chance of complete resection in patients with primarily unresectable liver tumors compared with conventional-staged hepatectomies: results of a multicenter analysis. *World J Surg* 38:1510-1519
160. Schnitzbauer AA, Lang SA, Goessmann H, Nadalin S, Baumgart J, Farkas SA, Fichtner-Feigl S, Lorf T, Goralcyk A, Hörbelt R (2012) Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings. *Annals of surgery* 255:405-414
161. Seifert JK, Morris DL (1999) World survey on the complications of hepatic and prostate cryotherapy. *World journal of surgery* 23:109-114

162. Sersa G, Krzic M, Sentjurc M, Ivanusa T, Beravs K, Kotnik V, Coer A, Swartz HM, Cemazar M (2002) Reduced blood flow and oxygenation in SA-1 tumours after electrochemotherapy with cisplatin. *Br J Cancer* 87:1047-1054
163. Sersa G (2006) The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study; advantages and clinical uses. *European Journal of Cancer Supplements* 4:52-59
164. Sersa G, Jarm T, Kotnik T, Coer A, Podkrajsek M, Sentjurc M, Miklavcic D, Kadivec M, Kranjc S, Secerov A (2008) Vascular disrupting action of electroporation and electrochemotherapy with bleomycin in murine sarcoma. *British journal of cancer* 98:388-398
165. Shibata T, Niinobu T, Ogata N, Takami M (2000) Microwave coagulation therapy for multiple hepatic metastases from colorectal carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 89:276-284
166. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, Jemal A (2017) Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67:177-193
167. Simoneau E, D'Angelica M, Halazun KJ (2019) Liver transplantation for colorectal liver metastasis. *Current opinion in organ transplantation* 24:175-181
168. Sperling J, Schäfer T, Ziemann C, Benz-Weiber A, Kollmar O, Schilling MK, Menger MD (2012) Hepatic arterial infusion of bevacizumab in combination with oxaliplatin reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases. *Clin Exp Metastasis* 29:91-99
169. Spiliotis AE, Holländer S, Rudzitis-Auth J, Wagenpfeil G, Eisele R, Nika S, Mallis Kyriakides O, Laschke MW, Menger MD, Glanemann M, Gäbelein G (2023) Evaluation of Electrochemotherapy with Bleomycin in the Treatment of Colorectal Hepatic Metastases in a Rat Model. *Cancers (Basel)* 15
170. Spiliotis AE, Holländer S, Wagenpfeil G, Eisele R, Nika S, Mallis Kyriakides O, Laschke MW, Menger MD, Glanemann M, Gäbelein G (2024) Electrochemotherapy with intravenous, intratumoral, or combined administration of bleomycin in the treatment of colorectal hepatic metastases in a rat model. *Sci Rep* 14:17361
171. Stintzing S, Fischer von Weikersthal L, Decker T, Vehling-Kaiser U, Jäger E, Heintges T, Stoll C, Giessen C, Modest DP, Neumann J, Jung A, Kirchner T, Scheithauer W, Heinemann V (2012) FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer-subgroup analysis of patients with KRAS: mutated tumours in the randomised German AIO study KRK-0306. *Ann Oncol* 23:1693-1699
172. Tesniere A, Schlemmer F, Boige V, Kepp O, Martins I, Ghiringhelli F, Aymeric L, Michaud M, Apetoh L, Barault L, Mendiboure J, Pignon JP, Jooste V, van Endert P, Ducreux M, Zitvogel L,

- Piard F, Kroemer G (2010) Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* 29:482-491
173. Toh JW, de Souza P, Lim SH, Singh P, Chua W, Ng W, Spring KJ (2016) The potential value of immunotherapy in colorectal cancers: review of the evidence for programmed death-1 inhibitor therapy. *Clinical colorectal cancer* 15:285-291
174. Van Amerongen M, Van Der Stok E, Fütterer J, Jenniskens S, Moelker A, Grünhagen D, Verhoef C, De Wilt J (2016) Short term and long term results of patients with colorectal liver metastases undergoing surgery with or without radiofrequency ablation. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 42:523-530
175. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, Bugat R, Findlay M, Frings S, Jahn M, McKendrick J, Osterwalder B, Perez-Manga G, Rosso R, Rougier P, Schmiegel WH, Seitz JF, Thompson P, Vieitez JM, Weitzel C, Harper P (2001) Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J Clin Oncol* 19:4097-4106
176. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P (2009) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360:1408-1417
177. Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, Beier F, Stroh C, Rougier P, van Krieken JH, Ciardiello F (2015) Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 33:692-700
178. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, Aranda Aguilar E, Bardelli A, Benson A, Bodoky G, Ciardiello F, D'Hoore A, Diaz-Rubio E, Douillard JY, Ducreux M, Falcone A, Grothey A, Gruenberger T, Haustermans K, Heinemann V, Hoff P, Köhne CH, Labianca R, Laurent-Puig P, Ma B, Maughan T, Muro K, Normanno N, Österlund P, Oyen WJ, Papamichael D, Pentheroudakis G, Pfeiffer P, Price TJ, Punt C, Ricke J, Roth A, Salazar R, Scheithauer W, Schmoll HJ, Tabernero J, Taïeb J, Tejpar S, Wasan H, Yoshino T, Zaanan A, Arnold D (2016) ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 27:1386-1422
179. Van Cutsem E, Huijberts S, Grothey A, Yaeger R, Cuyle PJ, Elez E, Fakih M, Montagut C, Peeters M, Yoshino T, Wasan H, Desai J, Ciardiello F, Gollerkeri A, Christy-Bittel J, Maharry K, Sandor V, Schellens JHM, Kopetz S, Tabernero J (2019) Binimetinib, Encorafenib, and Cetuximab Triplet Therapy for Patients With BRAF V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Safety Lead-In Results From the Phase III BEACON Colorectal Cancer Study. *J Clin Oncol* 37:1460-1469

180. van Sonnenberg E, McMullen W, Solbiati L (2005) Tumor ablation: principles and practice, Springer Science & Business Media).
181. Vernole P, Tedeschi B, Caporossi D, Maccarrone M, Melino G, Annicchiarico-Petruzzelli M (1998) Induction of apoptosis by bleomycin in resting and cycling human lymphocytes. *Mutagenesis* 13:209-215
182. Vogl TJ, Farshid P, Naguib NN, Darvishi A, Bazrafshan B, Mbalisike E, Burkhard T, Zangos S (2014) Thermal ablation of liver metastases from colorectal cancer: radiofrequency, microwave and laser ablation therapies. *La radiologia medica* 119:451-461
183. Wang D, Lippard SJ (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:307-320
184. Winther KV, Jess T, Langholz E, Munkholm P, Binder V (2004) Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2:1088-1095
185. Wouters BG, Koritzinsky M (2008) Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* 8:851-864
186. Yang YJ, Cao L, Li ZW, Zhao L, Wu HF, Yue D, Yang JL, Zhou ZR, Liu SX (2016) Fluorouracil-based neoadjuvant chemoradiotherapy with or without oxaliplatin for treatment of locally advanced rectal cancer: An updated systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 7:45513-45524
187. Yashiro M (2014) Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 20:16389-16397
188. Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Nagai T, Ogi M, Nomura M, Ishii H (2003) Vascular endothelial growth factor increases fenestral permeability in hepatic sinusoidal endothelial cells. *Liver Int* 23:467-475
189. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, Wolmark N (2011) Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol* 29:3768-3774
190. Yu H, Burke CT (2014). Comparison of percutaneous ablation technologies in the treatment of malignant liver tumors. Paper presented at: Seminars in interventional radiology (Thieme Medical Publishers).
191. Zhou J, Kang Y, Chen L, Wang H, Liu J, Zeng S, Yu L (2020) The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Front Pharmacol* 11:343
192. Zhou Y-F (2011) High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation. *World journal of clinical oncology* 2:8

193. Zmuc J, Gasljevic G, Sersa G, Edhemovic I, Boc N, Seliskar A, Plavec T, Brloznic M, Milevoj N, Breclj E, Kos B, Izlakar J, Jarm T, Snoj M, Stukelj M, Miklavcic D, Cemazar M (2019) Large Liver Blood Vessels and Bile Ducts Are Not Damaged by Electrochemotherapy with Bleomycin in Pigs. *Sci Rep* 9:3649

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.4.1: Gruppenverteilung und Therapieschemata.....	23
Abb. 3.4.2: Ablauf des Versuchsprotokolls.....	23
Abb. 3.5.1: Narkose- und Absorptionssysteme zur Tieranästhesie.....	24
Abb. 3.5.2: WAG/Rij Ratte (Tag 0) während Implantation der Tumorzellen.....	25
Abb. 3.5.3: Verschluss der abdominalen Faszie und der Haut.....	26
Abb. 3.6.1: SENNEX® Tumor Therapie System.	27
Abb. 3.7.1: Vevo Anesthesia System (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, ON, Kanada).....	29
Abb. 3.7.2: Ultraschallgel ohne Luftblasen (Aquasonic 100, Parker Laboratories, Inc., New Jersey, USA).....	29
Abb. 3.7.3: Vevo LAZR-System (FUJIFILM VisualSonics Inc., Toronto, ON, Kanada).....	30
Abb. 3.8.1.1: Flüssigstickstoff-Kryobehälter (TP100, Air Liquide S.A., Paris, Frankreich).....	31
Abb. 3.8.1.2: Olympus BX53-Mikroskop mit Olympus DP73 Kamera (Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japan).....	32
Abb. 3.8.3.1: Abaxis VetScan HM5, Scil Animal Care Company GmbH, Viernheim, Deutschland...	34
Abb. 4.2.1.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren SO ₂ -Werte vor der Behandlung. (<i>Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ</i>).....	37
Abb. 4.2.1.2: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren HbT-Werte vor der Behandlung. (<i>Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ</i>).....	38
Abb. 4.2.2.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren SO ₂ -Werte nach der Behandlung. (<i>Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ</i>).....	39
Abb. 4.2.2.2: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren HbT-Werte nach der Behandlung. (<i>Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ</i>).....	40
Abb. 4.2.2.3: HbT- und SO ₂ -Mapping mit Box-Plots der photoakustischen Bildgebung.....	41
Abb. 4.3.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Werte des Tumorgewebes nach der Behandlung. (<i>Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ</i>).....	42
Abb. 4.3.2: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Werte des nekrotischen Gewebes nach der Behandlung. (<i>Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ</i>).....	43
Abb. 4.3.3: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren prozentualen Mittelwerte der Nekrose nach der Behandlung. (<i>Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ</i>).....	44

Abb. 4.3.4: Histologische Darstellung der Tumornekrose mittels HE-Färbung und Box-Plot zum Vergleich der mittleren prozentualen Anteile des nekrotischen Areal im Tumorgewebe in den drei Gruppen nach der Behandlung. 45

Abb. 4.4.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Anzahl PCNA-positiver Zellen in den drei Behandlungsgruppen. 46

Abb. 4.4.2: Immunhistochemische Darstellung der PCNA-Expression und Box-Plot zum Vergleich des mittleren Anteils PCNA-positiven Zellen in den drei Gruppen nach der Behandlung. 47

Abb. 4.5.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Anzahl Caspase-3-positiver Zellen in den drei Behandlungsgruppen. (*Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ*) 48

Abb. 4.5.2: Immunhistochemische Darstellung der Caspase-3-positiven Zellen und Box-Plot zum Vergleich der mittleren Anzahl Caspase-3-positiver Zellen in den drei Gruppen nach der Behandlung. 49

Abb. 4.6.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Anzahl MPO-positiver Zellen in den drei Behandlungsgruppen. (*Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ*) 50

Abb. 4.6.2: Immunhistochemische Darstellung der MPO-positiven Zellen und Box-Plot zum Vergleich der mittleren Anzahl MPO-positiver Zellen in den drei Gruppen nach der Behandlung. 51

Abb. 4.7.1: Liniendiagramm zum Vergleich der mittleren Anzahl CD31-positiver Mikrogefäßen in den drei Behandlungsgruppen. (*Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ*) 52

Abb. 4.7.2: Immunhistochemische Darstellung der CD31-positiven Mikrogefäßen und Box-Plot zum Vergleich der mittleren Anzahl CD31-positiver Mikrogefäßen in den drei Gruppen nach der Behandlung..... 53

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.8.1: Ergebnisse der serologischen Untersuchung am Tag 13. *Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM angegeben.*..... 55

9. Anhang

Gepaarte Stichproben

Tabelle 1: Ultraschall und photoakustische Bildgebung - Statistik bei gepaarten Stichproben

Gruppen		N	Mittelwert	SEM	
1	Paar 1	Volume pretreatment (mm ³)	8	32.97	3.62
		Volume posttreatment (mm ³)	8	32.23	5.24
	Paar 2	SO2 Avr Total 3D pretreatment (%)	8	80.10	1.87
		SO2 Avr Total 3D posttreatment (%)	8	46.38	4.87
	Paar 3	HbT 3D, pretreatment	8	3111832245	277974915
		HbT 3D, posttreatment	8	2715357914	249346777
2	Paar 1	Volume pretreatment (mm ³)	8	30.49	2.49
		Volume posttreatment (mm ³)	8	30.39	6.53
	Paar 2	SO2 Avr Total 3D pretreatment (%)	8	78.95	1.37
		SO2 Avr Total 3D posttreatment (%)	8	74.29	1.50
	Paar 3	HbT 3D, pretreatment	8	3110611485	123307774
		HbT 3D, posttreatment	8	3045090523	133173573
3	Paar 1	Volume pretreatment (mm ³)	8	35.83	3.18
		Volume posttreatment (mm ³)	8	35.48	3.81
	Paar 2	SO2 Avr Total 3D pretreatment (%)	8	76.39	2.40
		SO2 Avr Total 3D posttreatment (%)	8	64.30	2.47
	Paar 3	HbT 3D, pretreatment	8	3100933663	220795545
		HbT 3D, posttreatment	8	2996377346	189454532
Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ					

Tabelle 2: Ultraschall und photoakustische Bildgebung - T-Test (Test bei gepaarten Stichproben)

Gruppen			Mittelwert	SEM	95% Konfidenzintervall der Differenz		T	df	Signifikanz
					Untergrenze	Obergrenze			Zweiseitiger p-Wert
1	Paar 1	Volume pretreatment - posttreatment (mm ³)	0.74	3.86	-8.38	9.86	0.192	7	0.853
	Paar 2	SO2 Avr Total 3D pretreatment - posttreatment (%)	33.73	6.15	19.18	48.27	5.484	7	0.001
	Paar 3	HbT 3D, pretreatment - posttreatment	396474331	77147457	214049582	578899080	5.139	7	0.001
2	Paar 1	Volume pretreatment - posttreatment (mm ³)	0.10	3.58	-6.92	7.12	-6.080	7	0.973
	Paar 2	SO2 Avr Total 3D pretreatment - posttreatment (%)	4.66	0.51	3.46	5.86	9.201	7	0.00001
	Paar 3	HbT 3D, pretreatment - posttreatment	65520962	37754025	-23753122	154795045	1.735	7	0.126
3	Paar 1	Volume pretreatment - posttreatment (mm ³)	0.35	3.48	-6.47	7.17	-4.957	7	0.736
	Paar 2	SO2 Avr Total 3D pretreatment - posttreatment (%)	12.09	1.05	9.61	14.57	11.522	7	0.0000008
	Paar 3	HbT 3D, pretreatment - posttreatment	104556316	37891539	14957064	194155569	2.759	7	0.028

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Deskriptive Statistik

**Tabelle 3: Ultraschall und photoakustische Bildgebung vor und nach der Behandlung
(Deskriptive Statistik)**

	Gruppe	N	Mittelwert	SEM	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
Volume pretreatment (mm ³)	1	8	32.97	3.62	24.41	41.53	21.42	55.26
	2	8	30.49	2.49	25.61	35.37	20.56	53.48
	3	8	35.83	3.18	29.60	42.06	26.00	43.65
	Gesamt	24	33.10	3.10	26.54	39.65	22.66	50.80
SO2 Avr Total 3D pretreatment (%)	1	8	80.10	1.87	75.68	84.52	73.00	87.70
	2	8	78.95	1.37	75.71	82.19	74.60	86.80
	3	8	76.39	2.40	70.72	82.06	65.10	83.30
	Gesamt	24	78.48	1.11	76.18	80.78	65.10	87.70
HbT 3D, pretreatment	1	8	3111832245	277974915	2454526019	3769138470	1771042392	4431123232
	2	8	3110611485	123307774	2819034931	3402188038	2730222362	3665309148
	3	8	3100933663	220795545	2578835161	3623032163	2310773316	4462904190
	Gesamt	24	3107792464	1197007167	2860172666	3355412262	1771042392	4462904190
Volume posttreatment (mm ³)	1	8	32.23	5.24	19.84	44.62	13.96	61.28
	2	8	30.39	6.53	14.94	45.84	11.68	69.70
	3	8	35.48	3.81	26.47	44.49	18.59	48.37
	Gesamt	24	32.70	2.96	26.57	38.83	11.68	69.70
SO2 Avr Total 3D posttreatment (%)	1	8	46.38	4.87	34.86	57.89	15.70	61.50
	2	8	74.29	1.50	70.74	77.83	69.30	81.30
	3	8	64.30	2.47	58.46	70.14	52.60	71.30
	Gesamt	24	61.65	3.01	55.43	67.88	15.70	81.30
HbT 3D, posttreatment	1	8	2715357914	249346777	2125746477	3304969350	1411730216	3855417368
	2	8	3045090523	133173573	2730185064	3359995983	2545911982	3659343592
	3	8	2996377346	189454532	2548388567	3444366126	2309175638	4147715228
	Gesamt	24	2918941928	112544382	2686126136	3151757719	1411730216	4147715228

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Histopathologische und immunhistochemische Untersuchung - außer PCNA

Tabelle 4: HE (Deskriptive Statistik)

	Gruppe	N	Mittelwert	SEM	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
Tumor mm ²	1	8	18.80	1.70	14.78	22.82	13.30	27.40
	2	8	17.53	3.73	8.70	26.36	3.07	31.13
	3	8	13.82	2.97	6.79	20.85	3.47	27.17
	Gesamt	24	16.72	1.67	13.26	20.18	3.07	31.13
Nekrose mm ²	1	8	15.86	2.02	11.09	20.64	9.10	26.30
	2	8	1.76	0.41	0.78	2.74	0.55	3.69
	3	8	3.58	0.95	1.35	5.82	0.92	8.01
	Gesamt	24	7.07	1.49	3.98	10.15	0.55	26.30
Prozent Nekrose	1	8	0.83	0.04	0.73	0.93	0.68	0.98
	2	8	0.11	0.01	0.08	0.14	0.05	0.18
	3	8	0.26	0.04	0.17	0.35	0.14	0.40
	Gesamt	24	0.40	0.07	0.26	0.54	0.05	0.98

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Tabelle 5: Caspase-3 (Deskriptive Statistik)

	Gruppe	N	Mittelwert	SEM	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
Caspase Zellen/HPF	1	8	7.16	0.66	5.60	8.73	4.60	11.00
	2	8	14.13	1.37	10.89	17.36	9.00	21.00
	3	8	13.25	1.21	10.38	16.12	9.60	17.90
	Gesamt	24	11.51	0.89	9.66	13.36	4.60	21.00

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Tabelle 6: MPO (Deskriptive Statistik)

	Gruppe	N	Mittelwert	SEM	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
MPO Zellen/HPF	1	8	7.05	0.62	5.59	8.51	4.60	9.50
	2	8	10.10	1.42	6.74	13.46	5.00	16.00
	3	8	11.01	0.92	8.83	13.19	8.00	15.70
	Gesamt	24	9.39	0.67	7.99	10.78	4.60	16.00

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Tabelle 7: CD31 (Deskriptive Statistik)

	Gruppe	N	Mittelwert	SEM	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
CD31 (mm ⁻²)	1	8	69.88	11.347	43.04	96.71	12	97
	2	8	95.00	4.512	84.33	105.67	79	112
	3	8	80.63	4.004	71.16	90.09	66	98
	Gesamt	24	81.83	4.622	72.27	91.39	12	112

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Serologische Untersuchungen

Tabelle 8: Serologische Untersuchungen (Deskriptive Statistik)

		N	Mittelwert	SEM	95% Konfidenzintervall		Minimum	Maximum
					Untergrenze	Obergrenze		
Leukozyten (10⁹/L)	1	8	9.49	1.02	7.07	11.90	5.59	13.44
	2	8	9.66	0.68	8.06	11.27	6.95	12.45
	3	8	8.97	0.52	7.75	10.19	7.06	10.91
	Gesamt	24	9.37	0.43	8.49	10.26	5.59	13.44
Lymphozyten (10⁹/L)	1	8	4.62	0.28	3.96	5.28	3.37	5.56
	2	8	4.62	0.34	3.80	5.43	3.03	5.65
	3	8	4.19	0.24	3.62	4.75	3.25	5.16
	Gesamt	24	4.47	0.17	4.13	4.82	3.03	5.65
Monophilen (10⁹/L)	1	8	0.85	0.20	0.39	1.31	0.19	1.60
	2	8	0.85	0.15	0.49	1.21	0.32	1.47
	3	8	0.81	0.12	0.53	1.09	0.49	1.34
	Gesamt	24	0.84	0.09	0.66	1.02	0.19	1.60
Neutrophilen (10⁹/L)	1	8	4.08	0.87	2.03	6.13	0.73	7.15
	2	8	4.54	0.59	3.16	5.93	2.40	7.04
	3	8	4.05	0.50	2.87	5.23	2.01	6.58
	Gesamt	24	4.23	0.37	3.46	5.00	0.73	7.15
Erythrozyten (10¹²/L)	1	8	6.79	0.22	6.27	7.30	5.56	7.57
	2	8	6.63	0.19	6.17	7.09	5.85	7.16
	3	8	6.57	0.20	6.09	7.05	5.46	7.15
	Gesamt	24	6.66	0.11	6.42	6.90	5.46	7.57
Hämoglobin (g/dl)	1	8	13.05	0.34	12.24	13.86	11.80	14.30
	2	8	12.94	0.23	12.40	13.47	11.90	13.90
	3	8	13.28	0.19	12.84	13.71	12.70	14.10
	Gesamt	24	13.09	0.15	12.79	13.39	11.80	14.30
Hämatokrit (%)	1	8	37.30	1.00	34.93	39.67	31.50	40.03
	2	8	36.38	1.20	33.54	39.22	31.76	40.65
	3	8	38.13	0.76	36.33	39.93	35.67	41.95
	Gesamt	24	37.27	0.57	36.08	38.46	31.50	41.95
Thrombozyten (10⁹/L)	1	8	604.00	36.02	518.83	689.17	419.00	699.00
	2	8	584.00	49.46	467.03	700.97	423.00	766.00
	3	8	592.00	38.26	501.53	682.47	400.00	799.00
	Gesamt	24	593.33	23.05	545.65	641.01	400.00	799.00

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)

Tabelle 9: Ultraschall und photoakustische Bildgebung vor und nach der Behandlung (ANOVA)

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Volume pretreatment (mm ³)	Zwischen den Gruppen	100.83	2	50.42	0.28	0.745
	Innerhalb der Gruppen	4500.29	21	214.30		
	Gesamt	4598.24	23			
SO2 Avr Total 3D pretreatment (%)	Zwischen den Gruppen	57.81	2	28.91	0.97	0.394
	Innerhalb der Gruppen	622.63	21	29.65		
	Gesamt	680.44	23			
HbT 3D, pretreatment	Zwischen den Gruppen	570478899948104	2	285239449974052	0.01	0.999
	Innerhalb der Gruppen	7908629881788280000	21	376601422942299000		
	Gesamt	7909200360688230000	23			
Volume posttreatment (mm ³)	Zwischen den Gruppen	106.35	2	53.18	0.24	0.792
	Innerhalb der Gruppen	4740.97	21	225.76		
	Gesamt	4847.33	23			
SO2 Avr Total 3D posttreatment (%)	Zwischen den Gruppen	3200.44	2	1600.22	18.70	0.00002
	Innerhalb der Gruppen	1796.56	21	85.55		
	Gesamt	4997.00	23			
HbT 3D, posttreatment	Zwischen den Gruppen	506849304344296000	2	253424652172148000	0.82	0.454
	Innerhalb der Gruppen	6484913975245740000	21	308805427392654000		
	Gesamt	6991763279590030000	23			

Histopathologische und immunhistochemische Untersuchung - außer PCNA (ANOVA)

Tabelle 10: HE (ANOVA)

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Tumor mm ²	Zwischen den Gruppen	107.16	2	53.58	0.78	0.470
	Innerhalb der Gruppen	1437.11	21	68.43		
	Gesamt	1544.27	23			
Nekrose mm ²	Zwischen den Gruppen	941.40	2	470.70	34.35	0.0000002
	Innerhalb der Gruppen	287.79	21	13.70		
	Gesamt	1229.19	23			
Prozent Nekrose	Zwischen den Gruppen	2.28	2	1.14	125.25	0.000000002
	Innerhalb der Gruppen	0.19	21	0.01		
	Gesamt	2.47	23			

Tabelle 11: Caspase-3 (ANOVA)

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Caspase Zellen/HPF	Zwischen den Gruppen	230.13	2	115.07	11.41	0.0004
	Innerhalb der Gruppen	211.73	21	10.08		
	Gesamt	441.87	23			

Tabelle 12: MPO (ANOVA)

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
MPO Zellen/HPF	Zwischen den Gruppen	68.90	2	34.45	3.97	0.034
	Innerhalb der Gruppen	182.19	21	8.68		
	Gesamt	251.09	23			

Tabelle 13: CD31 (ANOVA)

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
CD31 (mm ²)	Zwischen den Gruppen	2542.58	2	1271.29	2.89	0.078
	Innerhalb der Gruppen	9248.75	21	440.42		
	Gesamt	11791.33	23			

Serologische Untersuchungen

Tabelle 14: Serologische Untersuchungen (ANOVA)

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Leukozyten ($10^9/L$)	Zwischen den Gruppen	2.06	2	1.03	0.22	0.806
	Innerhalb der Gruppen	99.05	21	4.72		
	Gesamt	101.11	23			
Lymphozyten ($10^9/L$)	Zwischen den Gruppen	0.99	2	0.50	0.73	0.492
	Innerhalb der Gruppen	14.22	21	0.68		
	Gesamt	15.21	23			
Monophilen ($10^9/L$)	Zwischen den Gruppen	0.01	2	0.00	0.02	0.977
	Innerhalb der Gruppen	4.20	21	0.20		
	Gesamt	4.21	23			
Neutrophilen ($10^9/L$)	Zwischen den Gruppen	1.22	2	0.61	0.17	0.845
	Innerhalb der Gruppen	75.33	21	3.59		
	Gesamt	76.55	23			
Erythrozyten ($10^{12}/L$)	Zwischen den Gruppen	0.20	2	0.10	0.29	0.748
	Innerhalb der Gruppen	7.06	21	0.34		
	Gesamt	7.26	23			
Hämoglobin (g/dl)	Zwischen den Gruppen	0.47	2	0.24	0.44	0.650
	Innerhalb der Gruppen	11.29	21	0.54		
	Gesamt	11.77	23			
Hämatokrit (%)	Zwischen den Gruppen	12.24	2	6.12	0.76	0.481
	Innerhalb der Gruppen	169.57	21	8.07		
	Gesamt	181.81	23			
Thrombozyten ($10^9/L$)	Zwischen den Gruppen	1621.33	2	810.67	0.06	0.943
	Innerhalb der Gruppen	291636.00	21	13887.43		
	Gesamt	293257.33	23			

Post-hoc-Tests bei einfaktorieller Varianzanalyse

Tabelle 15a: Ultraschall und photoakustische Untersuchung vor der Behandlung (Post-hoc-Tests)

Abhängige Variable	Tests	Gruppen (I)	Gruppen (J)	Mittlere Differenz (I-J)	SEM	95% Konfidenzintervall		Signifikanz
						Untergrenze	Obergrenze	
Volume pretreatment (mm³)	LSD	1	2	2.48	6.11	-17.56	12.45	0.662
			3	-2.86	6.11	-16.87	15.79	0.841
		2	1	-2.48	6.11	-19.73	11.73	0.599
			3	-5.34	6.11	-14.37	19.93	0.631
		3	1	2.86	6.11	-19.53	21.95	0.531
			2	5.34	6.11	-13.71	20.58	1.000
	Bonferroni	1	2	2.48	6.11	-21.80	14.95	1.000
			3	-2.86	6.11	-20.38	16.34	1.000
		2	1	-2.48	6.11	-26.63	13.58	1.000
			3	-5.34	6.11	-13.33	21.93	1.000
		3	1	2.86	6.11	-16.55	23.95	1.000
			2	5.34	6.11	-21.21	22.13	1.000
	Games-Howell	1	2	2.48	7.21	-19.46	14.52	0.931
			3	-2.86	5.58	-21.76	22.89	0.974
		2	1	-2.48	6.54	-25.99	24.61	0.713
			3	-5.34	5.82	-12.89	19.54	0.877
		3	1	2.86	5.58	-15.38	26.91	0.712
			2	5.34	5.82	-14.74	15.41	1.000
SO2 Avr Total 3D pretreatment (%)	LSD	1	2	1.15	2.72	-4.51	6.81	0.677
			3	3.71	2.72	-1.95	9.38	0.187
		2	1	-1.15	2.72	-6.81	4.51	0.677
			3	2.56	2.72	-3.10	8.22	0.357
		3	1	-3.71	2.72	-9.38	1.95	0.187
			2	-2.56	2.72	-8.22	3.10	0.357
	Bonferroni	1	2	1.15	2.72	-5.93	8.23	1.000
			3	3.71	2.72	-3.37	10.80	0.561
		2	1	-1.15	2.72	-8.23	5.93	1.000
			3	2.56	2.72	-4.52	9.64	1.000
		3	1	-3.71	2.72	-10.80	3.37	0.561
			2	-2.56	2.72	-9.64	4.52	1.000
	Games-Howell	1	2	1.15	2.32	-4.98	7.28	0.874
			3	3.71	3.04	-4.30	11.72	0.462
		2	1	-1.15	2.32	-7.28	4.98	0.874
			3	2.56	2.76	-4.88	10.01	0.635
		3	1	-3.71	3.04	-11.72	4.30	0.462
			2	-2.56	2.76	-10.01	4.88	0.635
HbT 3D, pretreatment	LSD	1	2	1220759.750	306839299.529	-636886495.66	639328015.16	0.997
			3	10898582.000	306839299.529	-627208673.41	649005837.41	0.972
		2	1	-1220759.750	306839299.529	-639328015.16	636886495.66	0.997
			3	9677822.250	306839299.529	-628429433.16	647785077.66	0.975
		3	1	-10898582.000	306839299.529	-649005837.41	627208673.41	0.972
			2	-9677822.250	306839299.529	-647785077.66	628429433.16	0.975
	Bonferroni	1	2	1220759.750	306839299.529	-796975637.52	799417157.02	1.000
			3	10898582.000	306839299.529	-787297815.27	809094979.27	1.000
		2	1	-1220759.750	306839299.529	-799417157.02	796975637.52	1.000
			3	9677822.250	306839299.529	-788518575.02	807874219.52	1.000
		3	1	-10898582.000	306839299.529	-809094979.27	787297815.27	1.000
			2	-9677822.250	306839299.529	-807874219.52	788518575.02	1.000
	Games-Howell	1	2	1220759.750	304096795.010	-837352276.77	839793796.27	1.000
			3	10898582.000	354993980.764	-923680642.50	945477806.50	0.999
		2	1	-1220759.750	304096795.010	-839793796.27	837352276.77	1.000
			3	9677822.250	252894207.313	-673543317.72	692898962.22	0.999
		3	1	-10898582.000	354993980.764	-945477806.50	923680642.50	0.999
			2	-9677822.250	252894207.313	-692898962.22	673543317.72	0.999

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Tabelle 15b: Ultraschall und photoakustische Untersuchung nach der Behandlung (Post-hoc-Tests)

Abhängige Variable	Tests	Gruppen (I)	Gruppen (J)	Mittlere Differenz (I-J)	SEM	95% Konfidenzintervall		Signifikanz
						Untergrenze	Obergrenze	
Volume posttreatment (mm ³)	LSD	1	2	1.84	7.51	-13.79	17.46	0.809
			3	-3.25	7.51	-18.88	12.37	0.669
		2	1	-1.84	7.51	-17.46	13.79	0.809
			3	-5.09	7.51	-20.71	10.53	0.505
		3	1	3.25	7.51	-12.37	18.88	0.669
			2	5.09	7.51	-10.53	20.71	0.505
	Bonferroni	1	2	1.84	7.51	-17.71	21.38	1.000
			3	-3.25	7.51	-22.80	16.29	1.000
		2	1	-1.84	7.51	-21.38	17.71	1.000
			3	-5.09	7.51	-24.63	14.45	1.000
		3	1	3.25	7.51	-16.29	22.80	1.000
			2	5.09	7.51	-14.45	24.63	1.000
	Games-Howell	1	2	1.84	8.38	-20.20	23.88	0.974
			3	-3.25	6.48	-20.40	13.89	0.872
		2	1	-1.84	8.38	-23.88	20.20	0.974
			3	-5.09	7.56	-25.45	15.27	0.783
		3	1	3.25	6.48	-13.89	20.40	0.872
			2	5.09	7.56	-15.27	25.45	0.783
SO2 Avr Total 3D posttreatment (%)	LSD	1	2	-27.91	4.62	-37.53	-18.29	0.00001
			3	-17.92	4.62	-27.54	-8.31	0.001
		2	1	27.91	4.62	18.29	37.53	0.00001
			3	9.99	4.62	0.37	19.61	0.043
		3	1	17.92	4.62	8.31	27.54	0.001
			2	-9.99	4.62	-19.61	-0.37	0.043
	Bonferroni	1	2	-27.91	4.62	-39.94	-15.88	0.00002
			3	-17.92	4.62	-29.96	-5.89	0.003
		2	1	27.91	4.62	15.88	39.94	0.00002
			3	9.99	4.62	-2.04	22.02	0.128
		3	1	17.92	4.62	5.89	29.96	0.003
			2	-9.99	4.62	-22.02	2.04	0.128
	Games-Howell	1	2	-27.91	5.10	-42.36	-13.46	0.001
			3	-17.92	5.46	-32.81	-3.04	0.020
		2	1	27.91	5.10	13.46	42.36	0.001
			3	9.99	2.89	2.24	17.74	0.013
		3	1	17.92	5.46	3.04	32.81	0.020
			2	-9.99	2.89	-17.74	-2.24	0.013
HbT 3D, posttreatment	LSD	1	2	-329732609.750	277851321.480	-907556064.68	248090845.18	0.249
			3	-281019432.750	277851321.480	-858842887.68	296804022.18	0.323
		2	1	329732609.750	277851321.480	-248090845.18	907556064.68	0.249
			3	48713177.000	277851321.480	-529110277.93	626536631.93	0.863
		3	1	281019432.750	277851321.480	-296804022.18	858842887.68	0.323
			2	-48713177.000	277851321.480	-626536631.93	529110277.93	0.863
	Bonferroni	1	2	-329732609.750	277851321.480	-1052521131.70	393055912.20	0.746
			3	-281019432.750	277851321.480	-1003807954.70	441769089.20	0.970
		2	1	329732609.750	277851321.480	-393055912.20	1052521131.70	0.746
			3	48713177.000	277851321.480	-674075344.95	771501698.95	1.000
		3	1	281019432.750	277851321.480	-441769089.20	1003807954.70	0.970
			2	-48713177.000	277851321.480	-771501698.95	674075344.95	1.000
	Games-Howell	1	2	-329732609.750	282681827.802	-1096470385.14	437005165.64	0.497
			3	-281019432.750	313156246.644	-1107404410.43	545365544.93	0.651
		2	1	329732609.750	282681827.802	-437005165.64	1096470385.14	0.497
			3	48713177.000	231577675.873	-565409955.41	662836309.41	0.976
		3	1	281019432.750	313156246.644	-545365544.93	1107404410.43	0.651
			2	-48713177.000	231577675.873	-662836309.41	565409955.41	0.976

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Histologische und immunhistochemische Untersuchung - außer PCNA (Mehrfachvergleiche)

Tabelle 16: HE (Post-hoc-Tests)

Abhängige Variable	Tests	Gruppen (I)	Gruppen (J)	Mittlere Differenz (I-J)	SEM	95% Konfidenzintervall		Signifikanz
						Untergrenze	Obergrenze	
Tumor mm ²	LSD	1	2	1.27	4.14	-7.33	9.87	0.762
			3	4.98	4.14	-3.62	13.58	0.242
		2	1	-1.27	4.14	-9.87	7.33	0.762
			3	3.71	4.14	-4.89	12.31	0.380
		3	1	-4.98	4.14	-13.58	3.62	0.242
			2	-3.71	4.14	-12.31	4.89	0.380
	Bonferroni	1	2	1.27	4.14	-9.49	12.03	1.000
			3	4.98	4.14	-5.78	15.74	0.726
		2	1	-1.27	4.14	-12.03	9.49	1.000
			3	3.71	4.14	-7.05	14.47	1.000
		3	1	-4.98	4.14	-15.74	5.78	0.726
			2	-3.71	4.14	-14.47	7.05	1.000
	Games-Howell	1	2	1.27	4.10	-10.02	12.55	0.949
			3	4.98	3.42	-4.25	14.21	0.348
		2	1	-1.27	4.10	-12.55	10.02	0.949
			3	3.71	4.77	-8.85	16.27	0.723
		3	1	-4.98	3.42	-14.21	4.25	0.348
			2	-3.71	4.77	-16.27	8.85	0.723
Nekrose mm ²	LSD	1	2	14.10	1.85	10.25	17.95	0.0000002
			3	12.28	1.85	8.43	16.13	0.000001
		2	1	-14.10	1.85	-17.95	-10.25	0.0000002
			3	-1.82	1.85	-5.67	2.03	0.336
		3	1	-12.28	1.85	-16.13	-8.43	0.000001
			2	1.82	1.85	-2.03	5.67	0.336
	Bonferroni	1	2	14.10	1.85	9.29	18.92	0.000001
			3	12.28	1.85	7.47	17.10	0.000004
		2	1	-14.10	1.85	-18.92	-9.29	0.000001
			3	-1.82	1.85	-6.64	2.99	1.000
		3	1	-12.28	1.85	-17.10	-7.47	0.000004
			2	1.82	1.85	-2.99	6.64	1.000
	Games-Howell	1	2	14.10	2.06	8.15	20.06	0.0004
			3	12.28	2.23	6.16	18.40	0.001
		2	1	-14.10	2.06	-20.06	-8.15	0.0004
			3	-1.82	1.03	-4.67	1.03	0.232
		3	1	-12.28	2.23	-18.40	-6.16	0.001
			2	1.82	1.03	-1.03	4.67	0.232
Prozent Nekrose	LSD	1	2	0.72	0.05	0.62	0.82	0.000000000001
			3	0.56	0.05	0.46	0.66	0.0000000001
		2	1	-0.72	0.05	-0.82	-0.62	0.000000000001
			3	-0.15	0.05	-0.25	-0.05	0.004
		3	1	-0.56	0.05	-0.66	-0.46	0.0000000001
			2	0.15	0.05	0.05	0.25	0.004
	Bonferroni	1	2	0.72	0.05	0.59	0.84	0.000000000003
			3	0.56	0.05	0.44	0.69	0.0000000003
		2	1	-0.72	0.05	-0.84	-0.59	0.000000000003
			3	-0.15	0.05	-0.28	-0.03	0.013
		3	1	-0.56	0.05	-0.69	-0.44	0.0000000003
			2	0.15	0.05	0.03	0.28	0.013
	Games-Howell	1	2	0.72	0.04	0.59	0.84	0.0000003
			3	0.56	0.06	0.42	0.71	0.0000003
		2	1	-0.72	0.04	-0.84	-0.59	0.0000003
			3	-0.15	0.04	-0.27	-0.04	0.012
		3	1	-0.56	0.06	-0.71	-0.42	0.0000003
			2	0.15	0.04	0.04	0.27	0.012

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Tabelle 17: Caspase-3 (Post-hoc-Tests)

Abhängige Variable	Tests	Gruppen (I)	Gruppen (J)	Mittlere Differenz (I-J)	SEM	95% Konfidenzintervall		Signifikanz
						Untergrenze	Obergrenze	
Caspase Zellen/HPF	LSD	1	2	-6.96	1.59	-10.26	-3.66	0.0003
			3	-6.09	1.59	-9.39	-2.79	0.001
		2	1	6.96	1.59	3.66	10.26	0.0003
			3	0.88	1.59	-2.43	4.18	0.587
		3	1	6.09	1.59	2.79	9.39	0.001
			2	-0.88	1.59	-4.18	2.43	0.587
	Bonferroni	1	2	-6.96	1.59	-11.09	-2.83	0.001
			3	-6.09	1.59	-10.22	-1.96	0.003
		2	1	6.96	1.59	2.83	11.09	0.001
			3	0.88	1.59	-3.26	5.01	1.000
		3	1	6.09	1.59	1.96	10.22	0.003
			2	-0.88	1.59	-5.01	3.26	1.000
	Games-Howell	1	2	-6.96	1.52	-11.12	-2.80	0.003
			3	-6.09	1.38	-9.83	-2.35	0.003
		2	1	6.96	1.52	2.80	11.12	0.003
			3	0.88	1.83	-3.92	5.67	0.882
		3	1	6.09	1.38	2.35	9.83	0.003
			2	-0.88	1.83	-5.67	3.92	0.882

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Tabelle 18: MPO (Post-hoc-Tests)

Abhängige Variable	Tests	Gruppen (I)	Gruppen (J)	Mittlere Differenz (I-J)	SEM	95% Konfidenzintervall		Signifikanz
						Untergrenze	Obergrenze	
MPO Zellen/HPF	LSD	1	2	-3.05	1.47	-6.11	0.01	0.051
			3	-3.96	1.47	-7.03	-0.90	0.014
		2	1	3.05	1.47	-0.01	6.11	0.051
			3	-0.91	1.47	-3.98	2.15	0.542
		3	1	3.96	1.47	0.90	7.03	0.014
			2	0.91	1.47	-2.15	3.98	0.542
	Bonferroni	1	2	-3.05	1.47	-6.88	0.78	0.153
			3	-3.96	1.47	-7.79	-0.13	0.041
		2	1	3.05	1.47	-0.78	6.88	0.153
			3	-0.91	1.47	-4.74	2.92	1.000
		3	1	3.96	1.47	0.13	7.79	0.041
			2	0.91	1.47	-2.92	4.74	1.000
	Games-Howell	1	2	-3.05	1.55	-7.33	1.23	0.173
			3	-3.96	1.11	-6.91	-1.01	0.010
		2	1	3.05	1.55	-1.23	7.33	0.173
			3	-0.91	1.69	-5.43	3.61	0.854
		3	1	3.96	1.11	1.01	6.91	0.010
			2	0.91	1.69	-3.61	5.43	0.854

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Tabelle 19: CD31 (Post-hoc-Tests)

Abhängige Variable	Tests	Gruppen (I)	Gruppen (J)	Mittlere Differenz (I-J)	SEM	95% Konfidenzintervall		Signifikanz
						Untergrenze	Obergrenze	
CD31 (mm ²)	LSD	1	2	-25.13	10.49	-46.95	-3.30	0.026
			3	-10.75	10.49	-32.57	11.07	0.317
		2	1	25.13	10.49	3.30	46.95	0.026
			3	14.38	10.49	-7.45	36.20	0.185
		3	1	10.75	10.49	-11.07	32.57	0.317
			2	-14.38	10.49	-36.20	7.45	0.185
	Bonferroni	1	2	-25.13	10.49	-52.42	2.17	0.078
			3	-10.75	10.49	-38.05	16.55	0.952
		2	1	25.13	10.49	-2.17	52.42	0.078
			3	14.38	10.49	-12.92	41.67	0.556
		3	1	10.75	10.49	-16.55	38.05	0.952
			2	-14.38	10.49	-41.67	12.92	0.556
	Games-Howell	1	2	-25.13	12.21	-59.11	8.86	0.153
			3	-10.75	12.03	-44.55	23.05	0.658
		2	1	25.13	12.21	-8.86	59.11	0.153
			3	14.38	6.03	-1.44	30.19	0.077
		3	1	10.75	12.03	-23.05	44.55	0.658
			2	-14.38	6.03	-30.19	1.44	0.077

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Serologische Untersuchungen

Tabelle 20a: Serologische Untersuchungen (Post-hoc-Tests)

Abhängige Variable	Tests	Gruppen (I)	Gruppen (J)	Mittlere Differenz (I-J)	SEM	95% Konfidenzintervall		Signifikanz
						Untergrenze	Obergrenze	
Leukozyten (10 ⁹ /L)	LSD	1	2	-0.18	1.09	-2.43	2.08	0.874
			3	0.51	1.09	-1.74	2.77	0.640
		2	1	0.18	1.09	-2.08	2.43	0.874
			3	0.69	1.09	-1.57	2.95	0.532
		3	1	-0.51	1.09	-2.77	1.74	0.640
			2	-0.69	1.09	-2.95	1.57	0.532
	Bonferroni	1	2	-0.18	1.09	-3.00	2.65	1.000
			3	0.51	1.09	-2.31	3.34	1.000
		2	1	0.18	1.09	-2.65	3.00	1.000
			3	0.69	1.09	-2.13	3.51	1.000
		3	1	-0.51	1.09	-3.34	2.31	1.000
			2	-0.69	1.09	-3.51	2.13	1.000
	Games-Howell	1	2	-0.18	1.23	-3.44	3.09	0.989
			3	0.51	1.14	-2.60	3.63	0.895
		2	1	0.18	1.23	-3.09	3.44	0.989
			3	0.69	0.85	-1.56	2.94	0.704
		3	1	-0.51	1.14	-3.63	2.60	0.895
			2	-0.69	0.85	-2.94	1.56	0.704
Lymphozyten (10 ⁹ /L)	LSD	1	2	0.00	0.41	-0.85	0.86	0.998
			3	0.43	0.41	-0.42	1.29	0.305
		2	1	0.00	0.41	-0.86	0.85	0.998
			3	0.43	0.41	-0.42	1.29	0.306
		3	1	-0.43	0.41	-1.29	0.42	0.305
			2	-0.43	0.41	-1.29	0.42	0.306
	Bonferroni	1	2	0.00	0.41	-1.07	1.07	1.000
			3	0.43	0.41	-0.64	1.50	0.915
		2	1	0.00	0.41	-1.07	1.07	1.000
			3	0.43	0.41	-0.64	1.50	0.919
		3	1	-0.43	0.41	-1.50	0.64	0.915
			2	-0.43	0.41	-1.50	0.64	0.919
	Games-Howell	1	2	0.00	0.44	-1.16	1.17	1.000
			3	0.43	0.37	-0.53	1.40	0.487
		2	1	0.00	0.44	-1.17	1.16	1.000
			3	0.43	0.42	-0.68	1.54	0.573
		3	1	-0.43	0.37	-1.40	0.53	0.487
			2	-0.43	0.42	-1.54	0.68	0.573

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Tabelle 20b: Serologische Untersuchungen (Post-hoc-Tests)

Abhängige Variable	Tests	Gruppen (I)	Gruppen (J)	Mittlere Differenz (I-J)	SEM	95% Konfidenzintervall		Signifikanz	
						Untergrenze	Obergrenze		
Monophilen (10 ⁹ /L)	LSD	1	2	0.001	0.22	-0.46	0.47	0.996	
			3	0.04	0.22	-0.42	0.51	0.851	
		2	1	-0.001	0.22	-0.47	0.46	0.996	
			3	0.04	0.22	-0.42	0.51	0.855	
		3	1	-0.04	0.22	-0.51	0.42	0.851	
			2	-0.04	0.22	-0.51	0.42	0.855	
	Bonferroni	1	2	0.001	0.22	-0.58	0.58	1.000	
			3	0.04	0.22	-0.54	0.62	1.000	
		2	1	-0.001	0.22	-0.58	0.58	1.000	
			3	0.04	0.22	-0.54	0.62	1.000	
		3	1	-0.04	0.22	-0.62	0.54	1.000	
			2	-0.04	0.22	-0.62	0.54	1.000	
	Games-Howell	1	2	0.001	0.25	-0.65	0.65	1.000	
			3	0.04	0.23	-0.57	0.65	0.981	
		2	1	-0.001	0.25	-0.65	0.65	1.000	
			3	0.04	0.19	-0.47	0.55	0.975	
		3	1	-0.04	0.23	-0.65	0.57	0.981	
			2	-0.04	0.19	-0.55	0.47	0.975	
	Neutrophilen (10 ⁹ /L)	LSD	1	2	-0.46	0.95	-2.43	1.51	0.632
				3	0.04	0.95	-1.93	2.00	0.971
			2	1	0.46	0.95	-1.51	2.43	0.632
				3	0.50	0.95	-1.47	2.46	0.607
			3	1	-0.04	0.95	-2.00	1.93	0.971
				2	-0.50	0.95	-2.46	1.47	0.607
Bonferroni		1	2	-0.46	0.95	-2.92	2.00	1.000	
			3	0.04	0.95	-2.43	2.50	1.000	
		2	1	0.46	0.95	-2.00	2.92	1.000	
			3	0.50	0.95	-1.97	2.96	1.000	
		3	1	-0.04	0.95	-2.50	2.43	1.000	
			2	-0.50	0.95	-2.96	1.97	1.000	
Games-Howell		1	2	-0.46	1.05	-3.24	2.32	0.900	
			3	0.04	1.00	-2.66	2.73	0.999	
		2	1	0.46	1.05	-2.32	3.24	0.900	
			3	0.50	0.77	-1.53	2.52	0.800	
		3	1	-0.04	1.00	-2.73	2.66	0.999	
			2	-0.50	0.77	-2.52	1.53	0.800	
Erythrozyten (10 ¹² /L)		LSD	1	2	0.15	0.29	-0.45	0.76	0.602
				3	0.22	0.29	-0.39	0.82	0.464
			2	1	-0.15	0.29	-0.76	0.45	0.602
				3	0.06	0.29	-0.54	0.67	0.831
			3	1	-0.22	0.29	-0.82	0.39	0.464
				2	-0.06	0.29	-0.67	0.54	0.831
	Bonferroni	1	2	0.15	0.29	-0.60	0.91	1.000	
			3	0.22	0.29	-0.54	0.97	1.000	
		2	1	-0.15	0.29	-0.91	0.60	1.000	
			3	0.06	0.29	-0.69	0.82	1.000	
		3	1	-0.22	0.29	-0.97	0.54	1.000	
			2	-0.06	0.29	-0.82	0.69	1.000	
	Games-Howell	1	2	0.15	0.29	-0.61	0.92	0.859	
			3	0.22	0.30	-0.56	1.00	0.752	
		2	1	-0.15	0.29	-0.92	0.61	0.859	
			3	0.06	0.28	-0.67	0.80	0.973	
		3	1	-0.22	0.30	-1.00	0.56	0.752	
			2	-0.06	0.28	-0.80	0.67	0.973	

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

Tabelle 20c: Serologische Untersuchungen (Post-hoc-Tests)

Abhängige Variable	Tests	Gruppen (I)	Gruppen (J)	Mittlere Differenz (I-J)	SEM	95% Konfidenzintervall		Signifikanz	
						Untergrenze	Obergrenze		
Hämoglobin (g/dl)	LSD	1	2	0.11	0.37	-0.65	0.88	0.762	
			3	-0.23	0.37	-0.99	0.54	0.546	
		2	1	-0.11	0.37	-0.88	0.65	0.762	
			3	-0.34	0.37	-1.10	0.43	0.368	
		3	1	0.23	0.37	-0.54	0.99	0.546	
			2	0.34	0.37	-0.43	1.10	0.368	
	Bonferroni	1	2	0.11	0.37	-0.84	1.07	1.000	
			3	-0.23	0.37	-1.18	0.73	1.000	
		2	1	-0.11	0.37	-1.07	0.84	1.000	
			3	-0.34	0.37	-1.29	0.62	1.000	
		3	1	0.23	0.37	-0.73	1.18	1.000	
			2	0.34	0.37	-0.62	1.29	1.000	
	Games-Howell	1	2	0.11	0.41	-0.98	1.20	0.959	
			3	-0.23	0.39	-1.28	0.83	0.834	
		2	1	-0.11	0.41	-1.20	0.98	0.959	
			3	-0.34	0.29	-1.11	0.43	0.499	
		3	1	0.23	0.39	-0.83	1.28	0.834	
			2	0.34	0.29	-0.43	1.11	0.499	
	Hämatokrit (%)	LSD	1	2	0.92	1.42	-2.04	3.87	0.525
				3	-0.83	1.42	-3.78	2.12	0.565
			2	1	-0.92	1.42	-3.87	2.04	0.525
				3	-1.75	1.42	-4.70	1.21	0.232
			3	1	0.83	1.42	-2.12	3.78	0.565
				2	1.75	1.42	-1.21	4.70	0.232
Bonferroni		1	2	0.92	1.42	-2.78	4.61	1.000	
			3	-0.83	1.42	-4.53	2.87	1.000	
		2	1	-0.92	1.42	-4.61	2.78	1.000	
			3	-1.75	1.42	-5.44	1.95	0.696	
		3	1	0.83	1.42	-2.87	4.53	1.000	
			2	1.75	1.42	-1.95	5.44	0.696	
Games-Howell		1	2	0.92	1.56	-3.19	5.03	0.829	
			3	-0.83	1.26	-4.15	2.49	0.790	
		2	1	-0.92	1.56	-5.03	3.19	0.829	
			3	-1.75	1.42	-5.55	2.05	0.460	
		3	1	0.83	1.26	-2.49	4.15	0.790	
			2	1.75	1.42	-2.05	5.55	0.460	
Thrombozyten (10 ⁹ /L)		LSD	1	2	20.00	58.92	-102.54	142.54	0.738
				3	12.00	58.92	-110.54	134.54	0.841
			2	1	-20.00	58.92	-142.54	102.54	0.738
				3	-8.00	58.92	-130.54	114.54	0.893
			3	1	-12.00	58.92	-134.54	110.54	0.841
				2	8.00	58.92	-114.54	130.54	0.893
	Bonferroni	1	2	20.00	58.92	-133.28	173.28	1.000	
			3	12.00	58.92	-141.28	165.28	1.000	
		2	1	-20.00	58.92	-173.28	133.28	1.000	
			3	-8.00	58.92	-161.28	145.28	1.000	
		3	1	-12.00	58.92	-165.28	141.28	1.000	
			2	8.00	58.92	-145.28	161.28	1.000	
	Games-Howell	1	2	20.00	61.19	-141.89	181.89	0.943	
			3	12.00	52.55	-125.58	149.58	0.972	
		2	1	-20.00	61.19	-181.89	141.89	0.943	
			3	-8.00	62.53	-172.86	156.86	0.991	
		3	1	-12.00	52.55	-149.58	125.58	0.972	
			2	8.00	62.53	-156.86	172.86	0.991	

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

PCNA - Immunhistochemische Untersuchung

Tabelle 21: Kreuztabelle - PCNA

			Gruppen		
			1	2	3
PCNA	1	Anzahl	3	0	0
		% innerhalb PCNA	100.0%	0.0%	0.0%
		% innerhalb Gruppen	37.5%	0.0%	0.0%
	2	Anzahl	4	2	2
		% innerhalb PCNA	50.0%	25.0%	25.0%
		% innerhalb Gruppen	50.0%	25.0%	25.0%
	3	Anzahl	1	2	4
		% innerhalb PCNA	14.3%	28.6%	57.1%
		% innerhalb Gruppen	12.5%	25.0%	50.0%
	4	Anzahl	0	4	2
		% innerhalb PCNA	0.0%	66.7%	33.3%
		% innerhalb Gruppen	0.0%	50.0%	25.0%
Total	Anzahl	8	8	8	
	% innerhalb PCNA	33.3%	33.3%	33.3%	
	% innerhalb Gruppen	100.0%	100.0%	100.0%	
PCNA: 1 = 10%, 2 = 10–30%, 3 = 30–50%, 4 ≥ 50%					
Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ					

Tabelle 22: PCNA - Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Signifikanz (einseitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	13.000 ^a	6	0.043	0.036	
Likelihood Quotient	15.080	6	0.020	0.052	
Exakter Test nach Fisher	10.522			0.064	
Zusammenhang linear-mit-linear	6.161 ^b	1	0.013	0.015	0.008
Anzahl der gültigen Fälle	24				
a. 12 Zellen (100.0%) haben eine erwartete Heufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1.00.					
b. Die standardisierte Statistik ist 2.482.					

Tabelle 23: PCNA – Deskriptive Statistik

Gruppen	N	Mittelwert	SEM	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
				Untergrenze	Obergrenze		
1	8	1.75	0.250	1.16	2.34	1	3
2	8	3.25	0.313	2.51	3.99	2	4
3	8	3.00	0.267	2.37	3.63	2	4
Gesamt	24	2.67	0.206	2.24	3.09	1	4
Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ							

Tabelle 24: PCNA - Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)

Gruppen	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Between Groups	10.333	2	5.167	8.346	0.002
Within Groups	13.000	21	0.619		
Total	23.333	23			

Tabelle 25: PCNA - Post-hoc-Tests (Mehrfachvergleiche)

Abhängige Variable	Gruppen (I)	Gruppen (J)	Mittlere Differenz (I-J)	SEM	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
LSD	1	2	-1.5	0.393	0.001	-2.32	-0.68
		3	-1.25	0.393	0.005	-2.07	-0.43
	2	1	1.5	0.393	0.001	0.68	2.32
		3	0.250	0.393	0.532	-0.57	1.07
	3	1	1.25	0.393	0.005	0.43	2.07
		2	-0.250	0.393	0.532	-1.07	0.57
Bonferroni	1	2	-1.5	0.393	0.003	-2.52	-0.48
		3	-1.25	0.393	0.014	-2.27	-0.23
	2	1	1.5	0.393	0.003	0.48	2.52
		3	0.250	0.393	1.000	-0.77	1.27
	3	1	1.25	0.393	0.014	0.23	2.27
		2	-0.250	0.393	1.000	-1.27	0.77
Games-Howell	1	2	-1.5	0.401	0.006	-2.56	-0.44
		3	-1.25	0.366	0.011	-2.21	-0.29
	2	1	1.5	0.401	0.006	0.44	2.56
		3	0.250	0.412	0.819	-0.83	1.33
	3	1	1.25	0.366	0.011	0.29	2.21
		2	-0.250	0.412	0.819	-1.33	0.83

Gruppe: 1 = BLM, 2 = OXP, 3 = OXP/BVZ

10. Publikationen/Dank

10.1 Publikationen

Im Rahmen dieser Dissertation sowie im thematischen Umfeld des Projekts entstanden folgende Publikationen und Präsentationen.

Publikationen:

1. **Spiliotis, A.E., Mallis Kyriakides, O., Holländer, S., Wagenpfeil, G., Laschke, M.W., Glanemann, M., Gäbelein, G.** (2025). *Efficacy of Electrochemotherapy with Bleomycin, Oxaliplatin, or Oxaliplatin with Bevacizumab in the Treatment of Colorectal Hepatic Metastases in Rats.* **Cancers**, 17(17):2753. <https://doi.org/10.3390/cancers17172753>
2. **Spiliotis, A.E., Holländer, S., Wagenpfeil, G., Eisele, R., Nika, S., Mallis Kyriakides, O., Laschke, M.W., Menger, M.D., Glanemann, M., Gäbelein, G.** (2024). *Electrochemotherapy with intravenous, intratumoral, or combined administration of bleomycin in the treatment of colorectal hepatic metastases in a rat model.* **Scientific Reports**, 14, 17361 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67878-x>
3. **Spiliotis, A.E., Holländer, S., Rudzitis-Auth, J., Wagenpfeil, G., Eisele, R., Nika, S., Mallis Kyriakides, O., Laschke, M.W., Menger, M.D., Glanemann, M., Gäbelein, G.** (2023). *Evaluation of Electrochemotherapy with Bleomycin in the Treatment of Colorectal Hepatic Metastases in a Rat Model.* **Cancers** 15, (5) 1598. <https://doi.org/10.3390/cancers15051598>

Postervorstellung:

1. Poster-Vorstellung der Dissertation als Präsentation bei der Saarländischen Chirurgenvereinigung e.V. am 22.01.2025, Homburg (Universitätsklinikum des Saarlandes).
Titel: *Elektrochemotherapie mit intravenöser Verabreichung von Bleomycin, Oxaliplatin und Oxaliplatin in Kombination mit Bevacizumab zur Behandlung von hepatischen Metastasen des kolorektalen Karzinoms im Rattenmodell.*
Hauptautor: Orestis Mallis Kyriakides
Co-Autoren: Gereon Gäbelein; Antonios Spiliotis; Sebastian Holländer; Matthias W. Laschke; Michael D. Menger; Alic Mirza; Sotiris Tsiarlestos; Matthias Glanemann.

10.2 Dank

Zunächst möchte ich dem Universitätsklinikum des Saarlandes, insbesondere der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, meinen tiefen Dank für die Möglichkeit aussprechen, an dieser Studie mitzuwirken. Die fachliche Unterstützung und das inspirierende Umfeld dieser Institution haben entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Glanemann, Direktor der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, für seine wegweisende Unterstützung, seine wissenschaftliche Expertise und seine kontinuierliche Inspiration. Durch seine visionäre Herangehensweise und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten hat er die Grundlage für diese Dissertation geschaffen.

Ebenso möchte ich Dr. med. Gereon Gäbelein, Leitender Oberarzt der Klinik, für seine intensive Betreuung, seine wertvollen Anregungen und seine geduldige Unterstützung während der gesamten Promotionszeit danken. Seine fachliche Expertise und sein Engagement haben maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Dr. med. Antonios Spiliotis, Facharzt der chirurgischen Klinik CCM CVK an der Charité, danke ich für seine langjährige persönliche Betreuung und wertvolle Unterstützung. Durch seine Anleitung bei wichtigen Publikationen und Techniken hat er entscheidend zur Umsetzung des Projekts beigetragen, insbesondere in den ersten beiden Phasen der Studie.

Ein großer Dank gilt dem Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes, insbesondere an Prof. Dr. med. Michael Menger, Prof. Dr. med. Matthias Laschke, Dr. Jeanette Rusdzitis, Frau Janine Becker und Frau Christina Marx, für ihre Unterstützung und Beratung während der Experimente.

Ebenso danke ich dem Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik, insbesondere Frau Dipl.-Stat. Gudrun Wagenpfeil, für ihre wertvolle Unterstützung und fachkundige Beratung bei der statistischen Auswertung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Spyridon Nika, Dr. Mirza Alic, Dr. med. Christoforos Christofi, Vasiliki Sofroniou, Sotiris Tsiarlestos und Jule Anais Schophaus für ihre kontinuierliche Unterstützung und Ermutigung bedanken.

Abschließend gilt mein tiefster Dank meiner Familie und meinen Freunden, die stets an mich geglaubt und mich bedingungslos unterstützt haben. Eure Liebe und euer Vertrauen haben mir die nötige Kraft gegeben, diese Dissertation zu vollenden - ohne euch wäre dies nicht möglich gewesen.

11. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.