

**Etablierung eines transarteriellen Kathetermodells im  
Diethylnitrosamin-induzierten hepatozellulären Karzinom  
der Ratte zur Untersuchung der  
Tumorvaskularisation und -heterogenität**

**von Julia Gina Werner**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

**Etablierung eines transarteriellen Kathetermodells im  
Diethylnitrosamin-induzierten hepatozellulären Karzinom  
der Ratte zur Untersuchung der  
Tumervaskularisation und -heterogenität**

**von Julia Gina Werner**

**aus Weilheim in Oberbayern**

**München 2023**

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie**

**Arbeit angefertigt unter der Leitung von:**

**Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka**

**Angefertigt am Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie des  
Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München**

**Mentoren:** Prof. Dr. med. Rickmer Braren

PD Dr. med. Fabian Lohöfer

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner  
Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 22. Juli 2023

**Für Mama und Papa**

## INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	X
<b>I. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Hepatozelluläres Karzinom.....</b>	<b>9</b>
1.1. Angiogenese und Tumolvaskularisation.....	9
1.2. Hepatokarzinogenese und Tumorperfusion .....	10
1.3. Tumorerheterogenität .....	13
<b>2. Übersicht verwendeter Substanzen sowie deren pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften.....</b>	<b>18</b>
2.1. Cisplatin .....	18
2.2. Gadoxetsäure.....	20
<b>3. HCC des Menschen .....</b>	<b>23</b>
3.1. Diagnosealgorithmus in Deutschland .....	23
3.2. Staging-Systeme und Therapieoptionen .....	25
3.3. TNM-Staging .....	27
<b>4. Bildgebung .....</b>	<b>28</b>
4.1. Magnetresonanztomographie .....	28
4.2. Digitale Subtraktionsangiographie.....	29
<b>5. Pathohistologie und Immunhistochemie (IHC).....</b>	<b>30</b>
5.1. Pathohistologie.....	30
5.2. Immunhistochemie.....	36
<b>6. Massenspektrometrie.....</b>	<b>42</b>
6.1. Anwendungsgebiete .....	42
6.2. LA-ICP-MS.....	42
6.3. Elementimaging zur Untersuchung der Tumormikroumgebung .....	44
<b>7. Tierversuche in der Forschung und deren Translation.....</b>	<b>45</b>
7.1. Tierversuchsmodelle in der HCC-Forschung .....	45
7.2. Ethik von Tierversuchen und gesetzliche Grundlagen .....	47

---

7.3. Das 3-R-Prinzip .....	48
7.4. Translationale Relevanz für die Veterinärmedizin und rechtliche Grundlagen..	49
<b>III. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>51</b>
<b>1. Versuchstiere .....</b>	<b>51</b>
<b>2. Versuchstierhaltung.....</b>	<b>52</b>
<b>3. Versuchsaufbau .....</b>	<b>55</b>
<b>4. DENA-Induktion.....</b>	<b>56</b>
<b>5. MR-Bildgebung .....</b>	<b>56</b>
5.1. Vorbereitung der Tiere für die Bildgebungen.....	56
5.2. Überwachung der Vitalparameter während der Bildgebung.....	57
5.3. Tumorscreening .....	58
5.4. T1- Mapping und DCE-Bildgebung .....	58
5.5. Antagonisierung der Injektionsnarkose .....	59
<b>6. Angiographie .....</b>	<b>59</b>
6.1. Anästhesie .....	59
6.2. OP-Vorbereitung.....	60
6.3. Schmerzmanagement .....	60
6.4. Durchführung .....	60
<b>7. Gewebeaufarbeitung.....</b>	<b>66</b>
7.1. Tumorentnahme, Lagerung und Versand.....	66
<b>8. Pathohistologie .....</b>	<b>66</b>
8.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	67
8.2. Immunhistochemie.....	69
<b>9. Massenspektrometrie.....</b>	<b>73</b>
9.1. Massenspektrometrische Untersuchung.....	73
9.2. Probenvorbereitung und Anfertigung von Leerschnitten.....	73
9.3. Quantitatives Elementbioimaging mittels LA-ICP-MS der T1-Tumore .....	74
9.4. Gesamtgehaltbestimmung mittels SQ-ICP-MS der Resttumore (T2-T6).....	76
9.5. Auswertungen .....	78
<b>10. Statistik .....</b>	<b>81</b>
<b>IV. ERGEBNISSE.....</b>	<b>82</b>

---

<b>1. Pathohistologie .....</b>	<b>82</b>
1.1. Grading .....	82
1.2. Morphologische Veränderungen.....	82
1.3. Beurteilung der Vaskularisation mittels Immunhistochemie.....	84
1.4. Korrelationen von Grading (HE) und Vaskularisation (CD31).....	85
<b>2. Massenspektrometrie.....</b>	<b>86</b>
2.1. Fibrose-Staging .....	86
2.2. LA-ICP-MS der T1-Tumore .....	88
2.3. Gesamtgehalte der Resttumore T2-T6 .....	108
<b>V. DISKUSSION .....</b>	<b>112</b>
<b>1. Diskussion der Methodik und Limitationen.....</b>	<b>112</b>
1.1. Tiermodell.....	113
1.2. MR-Bildgebung .....	114
1.3. Angiographie.....	114
1.4. Pathohistologie.....	115
1.5. LA-ICP-MS und SQ-ICP-MS .....	115
1.6. Limitationen.....	116
<b>2. Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>117</b>
2.1. Pathohistologie.....	117
2.2. Ortsaufgelöste Massenspektrometrie der T1-Tumore .....	118
2.3. Gesamtgehalte der Resttumore T2-T6 .....	122
<b>3. Ausblick.....</b>	<b>123</b>
<b>VI. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>125</b>
<b>VII. SUMMARY.....</b>	<b>127</b>
<b>VIII. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>128</b>
<b>IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>138</b>
<b>X. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>143</b>
<b>XI. ANHANG .....</b>	<b>144</b>
<b>1. Vergrößerte Darstellung der 21 T1-Tumore (links Kryo-HE, mittig Gd, rechts Pt) .....</b>	<b>144</b>

---

**XII. DANKSAGUNG ..... 152**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AA	Aorta abdominalis
AASLD	engl.: American Association for the Study of the Liver Diseases
Abb.	Abbildung
ADC	engl.: apparent diffusion coefficient
Ang	Angiopoetin
Ar	Argon
a.u.	engl.: arbitrary unit
BCLC	engl.: Barcelona Clinic Liver Cancer
CD31/34/105	engl.: Cluster of Differentiation 31/34/105
CE	engl.: contrast enhanced
CEUS	engl.: contrast enhanced ultrasound
CLIP	Cancer of the Liver Italian Program
COVID-19	Coronavirus-Erkrankung 2019
CUPI	engl.: Chinese University Prognostic Index
CT	Computertomographie/-tomograph
cTACE	konventionelle transarterielle Chemoembolisation
CTR1	engl.: copper transporter 1
Cu	Kupfer
DAB	Diaminobenzidin
DCE	engl.: dynamic contrast enhanced
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser

---

DEB-TACE	engl.: Drug Eluting Beads - Transarterial Chemo-embolization
DEN/DENA	Diethylnitrosamin
dest.	destilliert
DMN	Dimethylnitrosamin
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
DWI	engl.: diffusion weighted imaging
engl.	englisch
EASL	European Association for the Study of the Liver
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	Edmondson-Steiner
Fe	Eisen
FCA/FCAs	engl.: Focus/Foci of cellular alteration
FDA	engl.: Food and Drug Administration
FGF	engl.: fibroblast growth factor
FLL	fokale Leberläsion
g	Gramm (bei Gewichtsangaben)
G	Gauge
Gd	Gadolinium
Gd-EOB-DTPA	Gadoliniumethoxybenzyl-diethylentriamin-Pentaessigsäure
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCA	hepatozelluläres Adenom
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDI	engl.: Human Development Index

---

H-DN	engl.: high-grade dysplastic nodule
HE	Hämatoxylin-Eosin
He	Helium
HKLC	Hong-Kong Liver Cancer
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
Ho	Holmium
HPF	High-Power-Feld
HSCs	engl.: hepatic stellate cells
i.d.R.	in der Regel
IHC	Immunhistochemie
JIS	engl.: Japan Integrated Staging
KM	Kontrastmittel
KCs	engl.: Kupffer cells
L	Liter
LA-ICP-MS	engl.: Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry
L-DN	engl.: low-grade dysplastic nodule
LHA	engl.: left hepatic artery
LOD	engl.: limit of detection
LOQ	engl.: limit of quantification
LSECs	engl.: liver sinusoidal endothelial cells
IWP	International Working Party
m	Meter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MALDI-MS	matrixunterstützte Laser-Desorptions/Ionisations- Massenspektrometrie

---

min	Minute
Mio.	Million
MWA	Mikrowellenablation
MRP	engl.: multidrug resistance-associated protein
MRT	Magnetresonanztomographie/-tomograph
MS	Massenspektrometrie
MVD	engl.: microvessel density
NAFL	engl.: nonalcoholic fatty liver
NAFLD	engl.: nonalcoholic fatty liver disease
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
NRP	engl.: Neuropilin-Receptor
OATP-Transporter	engl.: Organic Anion Transporting Polypeptide
P	Phosphor
PBS	engl.: phosphate-buffered saline
PDA	persistierender Ductus arteriosus botalli
PDGF	engl.: platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
Pt	Platin
RFA	Radiofrequenzablation
Rh	Rhodium
RHA	engl.: right hepatic artery
RL	Richtlinie
ROI/ROIs	engl.: region(s) of interest
ROS	engl.: reactive oxygen species
s	Sekunde

---

SARS-CoV-2-Virus	engl.: severe acute respiratory syndrome corona-virus type 2
Sc	Scandium
SIMS	Sekundärionen-Massenspektrometrie
T	Tesla
TAC	transarterielle Chemotherapie
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TAE	transarterielle Embolisation
TAMG	Tierarzneimittelgesetz
TARE	transarterielle Radioembolisation
TE	engl.: echo time
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchTrV	Tierschutztransportverordnung
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
TNM	engl.: tumor nodus metastase
TOCE	transarterielle ölige Chemoembolisation
TR	engl.: repetition time
TU	Technische Universität
UICC	engl.: International Union Against Cancer
UK	engl.: United Kingdom
US	engl.: ultrasound
USA	engl.: United States of America
VAA	vollständig antagonisierbare Anästhesie
VEGF	engl.: vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor

---

VersTierMeldV	Versuchstiermeldeverordnung
vWF	engl.: Faktor-VIII-related Antigen
WHO	engl.: World Health Organization
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität
Zn	Zink
ZPF	Zentrum für Präklinische Forschung

## I. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt mit 75 - 85 % die Hauptentität des primären Leberkrebses dar, wohingegen das intrahepatische Gallengangskarzinom mit 10 - 15 % und weitere seltenere Tumorarten einen deutlich geringeren Anteil einnehmen (Sung *et al.*, 2021). Merkmale des HCCs sind, neben seiner progressiven Entwicklung, eine hohe Rezidivrate sowie seine sehr schlechte Prognose (Ding *et al.*, 2011).

Primärer Leberkrebs war im Jahr 2020 mit etwa 906.000 Neuerkrankungen die sechsthäufigste diagnostizierte Krebserkrankung und mit fast 830.000 Toten die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit. Inzidenz- und Mortalitätsraten steigen stetig an und sind bei Männern regional unterschiedlich zwei- bis dreimal so hoch wie bei Frauen (Bray *et al.*, 2018; Sung *et al.*, 2021). Hohe Inzidenzraten finden sich im asiatischen Raum (v.a. Ost- und Südostasien) und Afrika (v.a. Nord- und Westafrika), Süd- und Nordamerika sowie in Europa (v.a. Westeuropa), wobei die höchsten Inzidenz- und Mortalitätsraten in Ländern mit hohem Human Development Index (HDI) zu verzeichnen sind (WHO, 2020).

Hierbei zeigt sich in den letzten Jahrzehnten ein deutlicher Wandel. Nach der Studie von Bray *et al.* (2012) gab es im Jahr 2008 noch deutlich mehr Leberkrebsneuerkrankungen und Todesfälle in Ländern mit niedrigem HDI (572.000; 532.000), als in Ländern mit hohem HDI (178.000; 163.000). Laut der aktuellen Version des Liver Globocan 2020 der WHO gab es im Jahr 2020 dagegen nur noch 33.097 Neuerkrankungen und 31.602 Todesfälle in Ländern mit niedrigem HDI gegenüber 548.935 Neuerkrankungen und 524.307 Todesfällen in denen mit hohem HDI (WHO, 2020). In Ländern mit niedrigem HDI ist weiterhin vorrangig eine Hepatitisvirusinfektion für die Entwicklung eines HCCs verantwortlich. In Schwellen- und Industrieländern hingegen entsteht es mit steigender Tendenz im Zusammenhang eines metabolischen Syndroms mit vorausgehender nichtalkoholischer Fettlebererkrankung (NAFLD) oder nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH). NAFLD ist in weiten Teilen der Welt, eingenommen Amerika und Europa, die am schnellsten ansteigende Ursache für die Entstehung eines HCCs. Im Gegensatz zur NASH, die über die Leberzirrhose im HCC mündet, stellen sich NAFLD-bedingte HCCs oftmals ohne den Hintergrund einer Zirrhose

dar (Huang, El-Serag and Loomba, 2021). Neben der bereits genannten Leberzirrhose stellen HBV- und HCV-Infektion, Aflatoxinkontamination, Rauchen, Adipositas, Diabetes mellitus und Alkoholabusus große Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCCs dar und machen es weltweit zu einem großen Gesundheitsproblem (Singal, Lampertico and Nahon, 2020; WHO, 2020; Sung *et al.*, 2021).

Die Abschätzung der Prognose, Auswahl von Therapieoptionen und das Tumorstaging ist beim HCC komplexer als bei den meisten anderen Tumorerkrankungen. Die Prognose wird vom klinischen Zustand des Patienten maßgeblich beeinflusst und hängt aufgrund der häufig mit der Krebserkrankung einhergehenden Vorschädigung der gesamten Leber von der zusätzlich vorhandenen Leberinsuffizienz und nicht allein von der Tumorgroße oder Tumorlast ab (op den Winkel *et al.*, 2012). Diese Komplexität spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Staging-Systemen wider, die beim HCC angewandt werden. Die Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)-Klassifizierung stellt hierbei das einzige System dar, das das Staging mit Behandlungsentscheidungen verknüpft und deshalb von europäischen und amerikanischen medizinischen Fachgesellschaften empfohlen wird (Galle *et al.*, 2018; Marrero *et al.*, 2018). Hinsichtlich einer zielgerichteten und erfolgreichen Therapie besteht eine zusätzliche Schwierigkeit in der genomischen und pathohistologischen Heterogenität. Neben der Identifikation unterschiedlicher molekularer Tumor-Subtypen (bspw. CTNNB1-, TERT- und TP53-Mutationen) und unterschiedlicher intratumoral vorhandener, pathohistologischer Wachstumsmuster ist eine fehlende Standardisierung bei der mikroskopischen Beurteilung als Problem vergleichender Untersuchungen aufzuführen. Für die histologische Beurteilung findet weltweit am häufigsten das Grading nach WHO (G1-G3) sowie das nach Edmondson und Steiner (G1-G4) Anwendung (Yamashita *et al.*, 2008; Ally *et al.*, 2017; Martins-Filho *et al.*, 2017; Bidkhor *et al.*, 2018; Longerich, 2020; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Im Laufe der Karzinogenese kommt es zur tumorinduzierten Angiogenese bzw. Neoangiogenese, also zur Neubildung von Blutgefäßen, insbesondere von unpaaren Arterien, die für das klassische Verhalten in der Bildgebung verantwortlich sind, wobei sich eine arterielle Hypervaskularisation des HCCs im Gegensatz zum umgebenden Leberparenchym zeigt (Moawad *et al.*, 2020). Die Hepatokarzinogenese ist ein komplexer, multimodaler Vorgang auf histologischer,

zellulärer und molekularer Ebene mit Veränderungen, die mittels nicht-invasiver Bildgebung aufgezeigt werden können. Deshalb spielen bildgebende Verfahren eine zentrale Rolle bei der Erkennung und der Diagnose des HCCs. Dazu zählen die kontrastmittelverstärkte Computertomographie (CE-CT) zur Detektion von größeren Läsionen ( $\geq 20$  mm) und aufgrund der höheren Sensitivität (62 % vs. 48 %) gegenüber der CT die kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (CE-MRT) bei einer Spezifität von 85 - 100 % insbesondere zur Detektion kleinerer Läsionen ( $< 20$  mm). Der Ultraschall mit oder ohne Kontrastmittelverstärkung findet zur initialen Einschätzung oder zum Screening Anwendung (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Mithilfe kontrastmittelverstärkter, mehrphasiger CT oder kontrastmittelverstärkter MRT kann, basierend auf dem definierten Anreicherungsverhalten des HCCs, die Diagnose auch ohne weitere histopathologische Bestätigung gestellt werden. Dieses Anreicherungsverhalten entspricht dem initialen sog. Hyperenhancement (Hyperintensität in der MRT, Hyperdensität in der CT, Hyperechogenität im Ultraschall) in der arteriellen Phase und dem darauffolgenden sog. Wash-out (Hypointensität in der MRT, Hypodensität in der CT, Hypoechogenität im Ultraschall), also einem schnelleren Auswaschen des Kontrastmittels in der portalvenösen und/oder Spätphase im Verhältnis zur umgebenden Leber. Hierfür stehen für die MRT entweder traditionelle, extrazelluläre Kontrastmittel auf Gadoliniumbasis (Gd-DTPA) oder Derivate, wie die Gadoliniumethoxybenzyl-diethylentriamin-Pentaessigsäure (Gd-EOB-DTPA), welche die Eigenschaften herkömmlicher extrazellulärer Kontrastmittel mit denen von hepatozytenspezifischen Kontrastmitteln kombiniert, zur Verfügung. Letztere zeigt in Studien Vorteile beim Nachweis und der Charakterisierung von Leberläsionen, da es zu einem unterschiedlichen hepatozytären Enhancement, abhängig von der Entdifferenzierung des HCCs kommt, wodurch Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad der Tumore gezogen werden können (Iavarone *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Trotz deutlicher Fortschritte im Verständnis der Epidemiologie, der Risikofaktoren, der molekularen Profile des HCCs und Entwicklung spezifischer Ansätze zur Prävention, Früherkennung, Überwachung und Therapie befindet sich weltweit die Mehrheit der HCC-Patienten bei Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, in dem eine kurative Therapie nicht mehr möglich ist (Yang *et*

*al.*, 2019). Die hohe Mortalität und die oft sehr späte Diagnosestellung des HCCs machen es nötig frühzeitig Aussagen über die Malignität und das Tumorverhalten *in vivo* stellen zu können. Aufgrund der Heterogenität der HCCs und des vermutlich darin begründeten individuellen Therapieansprechens sind weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet essenziell.

Als mögliche kurative Therapieoption stellt die Lebertransplantation, neben der chirurgischen Resektion lokal begrenzter Tumorknoten, die Methode der Wahl für Patienten im BCLC-Stadium A dar. Aufgrund mangelnder Spenderorgane ist sie jedoch nicht für alle Patienten gleichermaßen verfügbar (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Für inoperable HCCs existieren darüber hinaus perkutane Ablationsverfahren wie die Radiofrequenzablation (RFA) oder die Mikrowellenablation (MWA) sowie Systemtherapien mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (Raoul *et al.*, 2019). Beim progredienten HCC stehen interventionelle, transarterielle Techniken zur Verfügung. Diese sind neben der bereits erwähnten transarteriellen Chemoembolisation (TACE) die transarterielle Embolisation (TAE), die transarterielle ölige Chemoembolisation (TOCE), die transarterielle Chemotherapie (TAC) (Marelli *et al.*, 2007) wie auch die transarterielle Radioembolisation (TARE) (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Die TACE basiert auf der selektiven regionalen Applikation des Chemotherapeutikums in die, den Tumor versorgenden Hauptgefäße mit anschließender Okklusion. Hierdurch sollen, unter bestmöglicher Schonung des umgebenden Leberparenchyms, intratumoral hohe Zytostatikakonzentrationen erreicht und somit eine maximale Tumornekrose erzielt werden (Vogl *et al.*, 2007). Dabei werden Zytostatika (u.a. Doxorubicin, Cisplatin oder Mitomycin C) mit oder ohne Lipiodol, mit anschließender Embolisatgabe lokal in die A. hepatica oder deren Aufzweigungen injiziert. Lipiodol als öliges Kontrastmittel soll als Vehikel für den Transport und die Lokalisierung des Chemotherapeutikums innerhalb der Tumorzellen dienen (Marelli *et al.*, 2007). Als Embolisat werden meist Gelatineschwämme, Polyvinylalkoholpartikel oder Mikrosphären verwendet. Grundlegend ist bei der TACE die konventionelle (cTACE) von der Drug Eluting Beads TACE (DEB-TACE) zu unterscheiden. Bei letzterer werden arzneimittelfreisetzenden Kügelchen verwendet, wodurch über eine längere und andauernde Freisetzung des Wirkstoffs die ischämische Wirkung im Tumorgewebe verstärkt werden soll (Raoul *et al.*, 2019). Eine Verbesserung der

Überlebensprognose der Patienten konnte jedoch durch eine DEB-TACE im Vergleich zur cTACE nicht bestätigt werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Im Zuge der angiographischen Intervention werden bei der TACE zunächst die Aorta abdominalis, später der Truncus coeliacus sowie die A. mesenterica superior sondiert, mit dem Ziel sämtliche tumorversorgenden Arterien und deren Kollateralen darzustellen sowie das Vorliegen arteriovenöser oder arterioportaler Shunts und Pfortaderthrombosen auszuschließen. Je nach Größe und Lokalisation des Tumors wird anschließend die selektive, wenn möglich sogar superselektive Platzierung des Katheters vorgenommen. Nach korrekter Platzierung erfolgt unter gepulster Durchleuchtung die Applikation des Zytostatikums sowie der Embolisatemulsion (Vogl *et al.*, 2007). Durch die TACE besteht die Gefahr eine akute Hypoxie im Tumorgewebe zu induzieren, was nachfolgend aufgrund der Stimulierung des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) dazu beitragen kann, die Revaskularisation des Tumors zu begünstigen. Die Kombination aus TACE und Systemtherapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren sollte sowohl die erneute Tumorproliferation als auch die Revaskularisation nach erfolgreicher TACE hemmen. Bis dato konnte allerdings in mehreren Studien kein Nutzen einer Kombinationstherapie nachgewiesen werden (Lencioni *et al.*, 2016; Kudo *et al.*, 2018; Raoul *et al.*, 2019). Abschließend ist festzuhalten, dass derzeit keine verlässlichen Prädiktoren für das Ansprechen des HCCs auf eine TACE existieren.

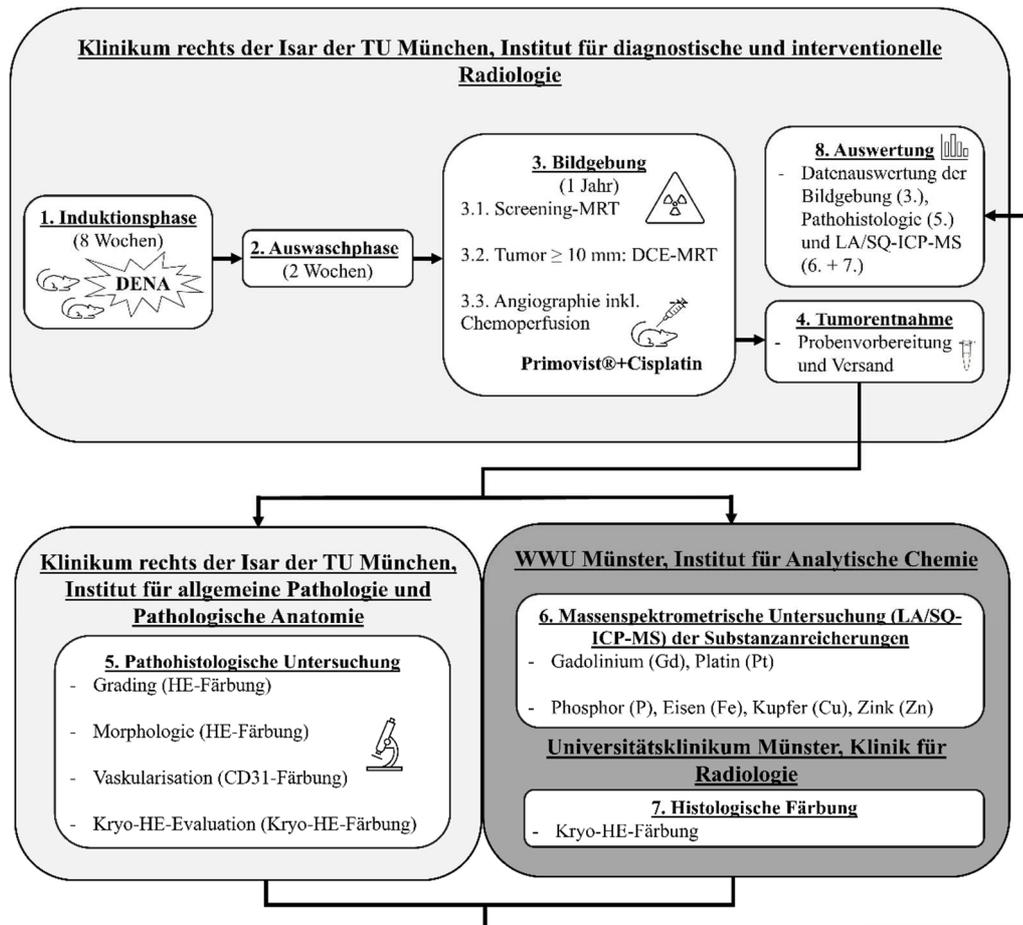
Ziel der vorliegenden Orientierungsstudie ist es, ein katheter-basiertes *in vivo*-Tiermodell im DENA-induzierten HCC der Ratte zu etablieren. Hierin sollen verschiedene *in vivo*- und *ex vivo*-Methoden zur Untersuchung von Tumorheterogenität und insbesondere Tumorperfusion angewendet werden. Es soll z.B. die dynamisch mittels Durchleuchtung und Magnetresonanztomographie (MRT) gemessene *in vivo*-Kontrastmittelanflutung mit der Kontrastmittel- und der Cisplatinablagerung mittels Massenspektrometrie (LA-ICP-MS: Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) korreliert werden. So sollen Zusammenhänge zwischen Bildgebungscharakteristika (Perfusionsparametern der MRT und der Angiographie) und morphomolekularen Gewebecharakteristika aufgedeckt werden. Langfristiges Ziel ist die Identifizierung von Bildgebungsparametern für die nicht-invasive Charakterisierung der intra- und interindividuellen Tumorheterogenität, sowie Prädiktion des Therapieansprechens einzelner Tumorknoten auf katheter-basierte Interventionen. Eine klinische

---

Translation bestünde aus tier-/medizinischer Sicht in der Etablierung einer fundierten Stratifizierungsmöglichkeit von Patienten bezüglich eines Einsatzes der katheter-basierten Therapie.

Inhalt dieser Doktorarbeit ist die Etablierung und Analyse der katheter-basierten transarteriellen Intervention in dem DENA-induzierten HCC der Ratte inklusive der Vorbereitung, Bearbeitung, Erhebung und Auswertung der pathohistologisch und massenspektrometrisch erhobenen Daten und deren Korrelation mit dem Zweck die Tumervaskularisation sowie Tumorerogenität genauer zu untersuchen.

Die Etablierung der Bildgebungssequenz der kontrastmittelverstärkten MRT (DCE-MRT) und digitale Subtraktionsangiographie (DSA) sowie deren Korrelation mit Pathohistologie und Massenspektrometrie sind Teil einer anderen Arbeit, sollen aber, da sie für den Gesamtkontext der Studie bedeutend sind, in dieser Arbeit der Vollständigkeit halber kurz dargestellt werden. Der praktische Versuch lässt sich in folgende Abschnitte einteilen (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und Übersicht kooperierender Institute (Klinikum rechts der Isar der TU München hellgrau, WWU und Universitätsklinikum Münster dunkelgrau hinterlegt)**

1. Induktionsphase: Achtwöchige DENA-Induktion der HCCs über das Trinkwasser.
2. Auswaschphase: Zweiwöchige Auswaschphase zur Elimination des DENAs aus den Ratten.
3. Bildgebung:
  - 3.1. Screening: Wöchentliches Screening zur Tumordetektion und Verlaufskontrolle des Tumorwachstums im 7T-Kleintiermagnetresonanztomographen.
  - 3.2. DCE-MRT: Kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie bei Tumoren  $\geq 10$  mm (entsprechen nachfolgend T1-Tumoren, sog. T1; Resttumore  $\leq 10$  mm entsprechen T2-T6-Tumoren, sog. T2-T6) zur Bestimmung von Perfusionsparametern und Anfertigung einer Spätphase im 7T-Kleintiermagnetresonanztomographen.

- 3.3. Angiographie inkl. Chemoperfusion: Etablierung der Methodik. Über einen links-transcarotidalen Zugang erfolgt mittels eines Mikrokatheters die Katheterisierung der Leberarterie (falls möglich die selektive Sondierung der rechten und linken Leberarterie). Es folgt eine Mikropumpen-gesteuerte Kontrastmittelinjektion und Anfertigung einer Durchleuchtungsserie. Anschließend findet die intravenöse Kontrastmittelinjektion (Primovist®) bei simultaner intraarterieller Gabe des Chemotherapeutikums (Cisplatin) statt.
4. Tumorentnahme: Abschließend erfolgt die Euthanasie des Tieres und die Entnahme der Organe und Tumore nach einer definierten Zeitspanne. Die Tumore werden für die weitere pathohistologische sowie massenspektrometrische Untersuchung vorbereitet und Teilproben versandt.
  5. Pathohistologische Untersuchung: Anfertigung von HE-Färbungen zur Einstufung des Gradings (G1-G3) der HCCs und Morphologiebeurteilung (u.a. Fibrose, Nekrose, Tumorstufen) sowie CD31-Färbung zur Vaskularisationsquantifizierung. Es erfolgt die detaillierte Untersuchung der Kryo-HE-Schnitte sowie die parallele Begutachtung der LA-ICP-MS-Bilder, um Rückschlüsse zwischen ROIs (regions of interest) zu ziehen.
  6. Massenspektrometrische Untersuchung: Ortsaufgelöste Messung (LA-ICP-MS) der T1-Tumore und nicht-ortsaufgelöste Messung (SQ-ICP-MS) der Resttumore T2-T6 der Elementverteilungen von Gadolinium (Gd), Platin (Pt), Phosphor (P), Eisen (Fe), Kupfer (Cu) und Zink (Zn) sowie des Lebergewebes.
  7. Histologische Färbung der Kryo-Proben: Färbung von HE-Schnitten, die parallel zum LA-ICP-MS-Schnitt angefertigt wurden und die der morphologischen Untersuchung der Tumorknoten dienen sollen.
  8. Auswertung und Korrelation der Ergebnisse: Zuletzt erfolgt die Zusammenfassung aller Untersuchungsergebnisse sowie deren Korrelation.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Hepatozelluläres Karzinom

#### 1.1. Angiogenese und Tumervaskularisation

Die Angiogenese wurde bereits bei vielen Neoplasien, so auch beim HCC genauer untersucht. Das Besondere am HCC ist aber, dass es einen der am stärksten hypervaskularisierten Tumore darstellt (Bösmüller *et al.*, 2018).

Beim HCC spielt die tumorausonome Angiogenese, die sehr stark mit der Progression, Metastasierung sowie Prognose korreliert eine entscheidende Rolle. Gefäßveränderungen betreffen hierbei insbesondere eine gesteigerte Arterialisierung und die sinusoidale Kapillarisation (Yang and Poon, 2008; Morse *et al.*, 2019). HCCs können, wie auch einige andere solide Tumore ohne Angiogenese nicht mehr als einige Millimeter groß werden. Durch den Prozess des sog. angiogenen Switch (engl. angiogenic switch) ist das HCC in der Lage, ausgehend von einem dysplastischen Knoten (DN), über die Bildung vielzähliger unpaarer Arterien, die also nicht von Gallengängen begleitet werden, zu wachsen und seine Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sicher zu stellen. Durch ein Ungleichgewicht an angiogenen Faktoren zugunsten der proangiogenen gegenüber der antiangiogenen Faktoren wird der Prozess der Angiogenese stimuliert. Dieser stellt den limitierenden Faktor der Hepatokazinogenese dar (Sugimachi *et al.*, 2002; Semela, 2012; Liu *et al.*, 2017; Mossenta *et al.*, 2019).

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) nimmt neben dem komplexen Zusammenspiel diverser anderer Vorgänge und Faktoren wie bspw. dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Angiopoetin (Ang), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und membrangebundenen Neuropilin-Rezeptoren (NRP) eine Hauptrolle bei der tumorinduzierten Angiogenese ein. VEGF wird normalerweise im menschlichen Körper nur in geringen Mengen exprimiert, hat in Tumoren jedoch eine sehr hohe Expressionrate. VEGF-A ist die Isoform, die für die Angiogenese verantwortlich ist. Sie bindet an den VEGF-Rezeptor (VEGFR), überwiegend an VEGFR-1 und -2 und stimuliert dadurch ein Transduktionssignal, das zur Proliferation und Migration von Endothelzellen führt und schließlich die Angiogenese induziert (Matsui *et al.*, 2011; Moawad *et al.*, 2020). Einen starken Stimulus der VEGF-Expression stellt die Hypoxie im Zentrum wachsender Tumore

dar. Die Hochregulierung von VEGF fördert das Zellüberleben und induziert, insbesondere in der Tumorperipherie, die Bildung neuer Blutgefäße. So kann der Tumor, während anhaltender zentraler Hypoxie, peripher weiter wachsen (Semela, 2012).

## 1.2. Hepatokarzinogenese und Tumorperfusion

Die Hepatokarzinogenese wird, wie oben beschrieben, maßgeblich durch die Angiogenese limitiert. Sie besteht aus mehreren, komplexen Schritten auf molekularer (Onkogene, Tumorsuppressorgene), zellulärer (Transformation reifer Hepatozyten oder intrahepatischer Stammzellen) und histologischer Ebene (Entwicklung eines HCCs aus einem low-grade dysplastischen Knoten (L-DN) über einen high-grade dysplastischen Knoten (H-DN)). Das HCC wird in ein frühes (< 2 cm Durchmesser, hochdifferenziert, nicht umkapselt, kein signifikantes Metastasierungsrisiko) und ein progredientes HCC (mäßig differenziert, häufig Anzeichen einer mikrovaskulären Invasion, erhöhtes Metastasierungsrisiko) untergliedert (Matsui *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021). Die International Working Party (IWP) klassifiziert knotige Läsionen bei chronischen Lebererkrankungen in große regenerative Knoten, low-grade dysplastische Knoten, high-grade dysplastische Knoten, frühe und fortgeschrittene HCCs (Kojiro *et al.*, 2009). L-DN und H-DN werden als potenzielle Vorläuferläsionen des HCCs betrachtet.

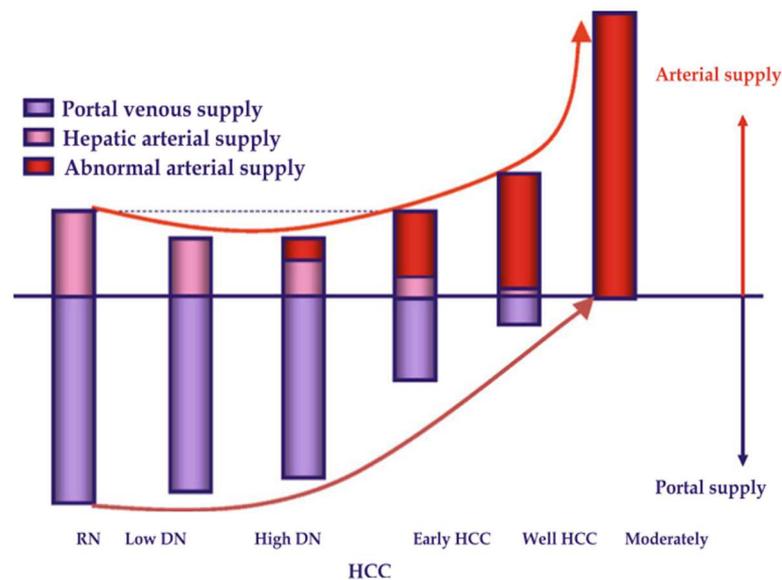
In Tabelle 1 wurden relevante Unterschiede knotiger Läsionen nach Schlageter *et al.* (2014) zusammengefasst.

**Tabelle 1: Histopathologische Unterschiede zwischen L-DN und H-DN**

	L-DN	H-DN
<b>Kern-Zytoplasma-Verhältnis</b>	normal bis leicht erhöht	erhöht
<b>Zellatypie</b>	minimal	deutlich (Kernhyperchromasie, unregelmäßige Kerngrenzen, periphere Lage des Kerns, basophiles Zytoplasma)
<b>Mitosen</b>	keine	gelegentlich
<b>Zellschichten</b>	1 - 2	> 2
<b>Portalfeld, Retikulinnetzwerk</b>	intakt	nicht intakt
<b>Unpaare Arterien</b>	selten	gelegentlich

Die WHO und die International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia schlägt für das frühe und späte HCC folgende Klassifikation vor: Das frühe HCC ist meist gut differenziert, von kleiner Größe (< 2 cm), besitzt unscharf definierte Ränder und hat ein vages, knotiges Aussehen. Das fortgeschrittene HCC ist größer (> 2 cm), meist moderat differenziert, besitzt ein ausgeprägtes knotiges Muster und zeigt häufig Anzeichen einer mikrovaskulären Invasion (Kojiro *et al.*, 2009; Schlageter *et al.*, 2014). Auf die detaillierte, histopathologische Einteilung des HCCs wird im entsprechenden Kapitel genauer eingegangen.

Parallel zum Differenzierungsgrad des HCCs entwickelt sich sein Gefäßsystem. Die Pfortaderversorgung (Portal venous supply) nimmt mit zunehmendem Malignitätsgrad der Knoten ab und verschwindet bei mäßig differenzierten HCCs. Andererseits nimmt die arterielle Versorgung (Hepatic arterial supply) zunächst im Frühstadium ab, steigt dann akut an und schließlich wird der gesamte Knoten bei mäßig differenzierten HCCs arteriell, insbesondere von unpaaren Arterien (Abnormal arterial supply), versorgt (siehe Abbildung 2). Das Ausbilden einer fibrösen Kapsel sowie eine sog. Knoten-in-Knoten-Architektur sind ebenso charakteristische Merkmale der Hepatokarzinogenese, wie die Downregulation der Expression wichtiger Proteintransporter - z.B. die des organischen Anionentransporters/Organic anion transporting polypeptide (OATP-Transporter) (Matsui *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2018; Rimola, 2020).



**Abbildung 2: Veränderung der Gefäßversorgung im Zuge der Hepatokarzinogenese (Matsui *et al.*, 2011, S. 270)**

All diese Veränderungen bedingen das typische Perfusionsverhalten des HCCs in der kontrastmittelverstärkten Bildgebung. Dies sind eine arterielle Hypervaskularisation (arterielles Hyperenhancement), gefolgt von einem progressiven Kontrastmittelauswaschen (Wash-out) aus dem Tumor bis hin zur Kontrastumkehr verglichen zum umgebenden Leberparenchym. Dagegen schließt das Fehlen eines Wash-outs ein HCC aber nicht zwingend aus, da insbesondere kleinere HCCs aufgrund der weniger weit fortgeschrittenen Angiogenese kein klassisches Kontrastmittelverhalten zeigen (Matsui *et al.*, 2011; Shah, Shukla and Paunipagar, 2014; Ayuso *et al.*, 2018; Zhong *et al.*, 2020).

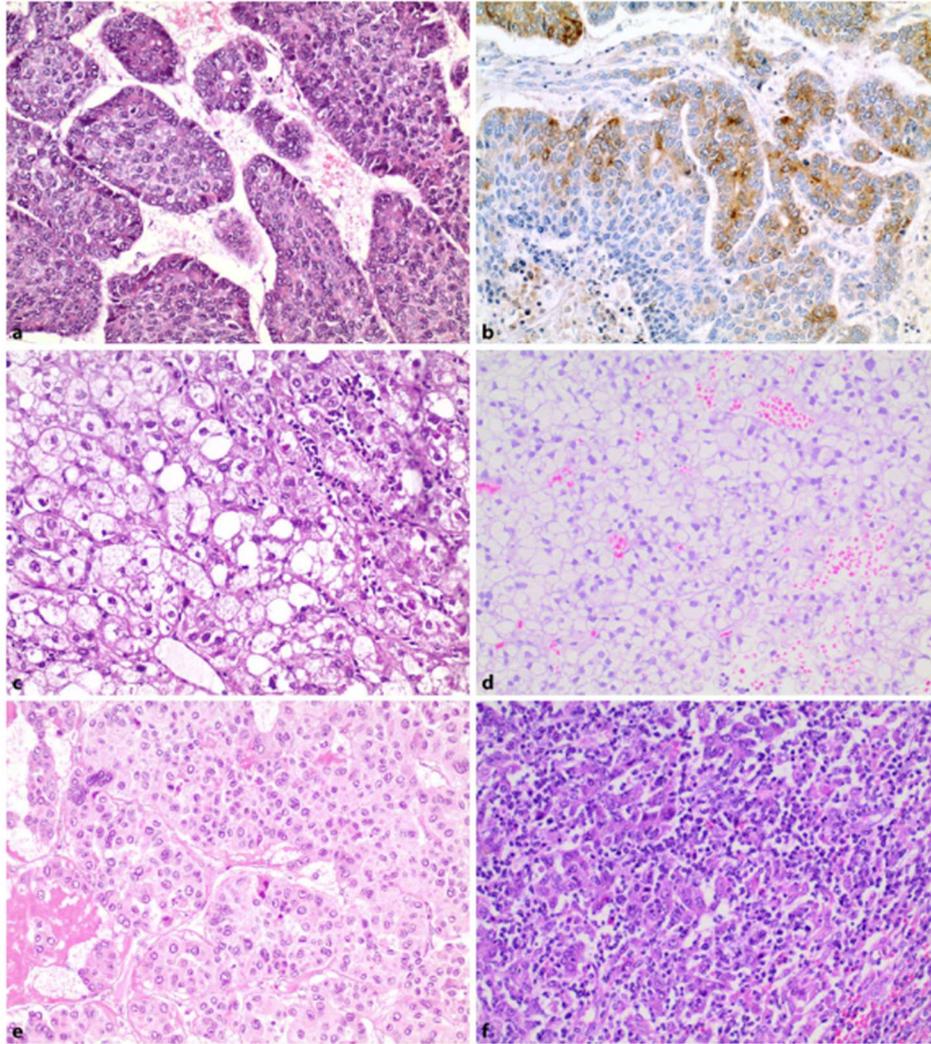
Durch die komplexen Vorgänge aus Angiogenese und Hepatokarzinogenese wird verdeutlicht, dass diverse Einflussfaktoren dazu führen können, dass sich kein eindeutiges radiologisches Bild akquirieren lässt, was wiederum die Diagnosestellung erheblich erschwert und verlangsamt und deshalb Gegenstand aktueller Forschung ist. Umso wichtiger ist es daher genauere Aussagen über die *in vivo*-Bildgebung treffen zu können und weitere nicht invasive Parameter zu etablieren, um den Malignitätsgrad und das Therapieansprechen des HCCs genauer einschätzen zu können.

### 1.3. Tumorheterogenität

#### 1.3.1. Pathohistologische und molekulare Heterogenität

Die Tumorheterogenität des HCCs stellt eine große Herausforderung für die Identifizierung von Biomarkern sowie für die Entwicklung und zielgerichtete Verabreichung systemischer, molekularer Therapien dar (Friemel *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2016). Dabei lassen sich eine intertumorale Heterogenität zwischen verschiedenen Patienten und eine intertumorale Heterogenität innerhalb multipler Knoten in der Leber eines Patienten von der individuellen intratumoralen Heterogenität des einzelnen Tumors unterscheiden. Des Weiteren kann die Tumorheterogenität aus pathohistologischer, molekularer und genomischer Sicht analysiert werden (Liu, Dang and Wang, 2018; Zhang, Lou, *et al.*, 2020; Chan *et al.*, 2021).

Aus pathohistologischer Sicht weisen die meisten HCCs ein trabekuläres, pseudoglanduläres oder solides Wachstum auf. Darüber hinaus finden sich weitere diverse Differenzierungsmuster, die im Sinne einer intratumoralen Heterogenität in vielfältigen Kombinationen auftreten können. Hierzu gehören eine Reihe neuer HCC-Subtypen, die in der erst kürzlich aktualisierten WHO-Klassifikation der Leberkarzinome mitaufgenommen wurden. Dazu zählen der a. steatohepatische, b. klarzellige, c. makrotrabekulär-massive, d. szirrhöse, e. chromophobe, f. fibrolammeläre, g. neutrophilenreiche und h. lymphozytenreiche Subtyp (siehe Abbildung 3). Diese sog. morphomolekularen Subtypen könnten, sofern ihnen in zukünftigen klinischen Studien Aufmerksamkeit geschenkt wird, eine wichtige Rolle auf dem Weg in Richtung Präzisionsonkologie des HCCs spielen (Schlageter *et al.*, 2014; Longrich, 2020).

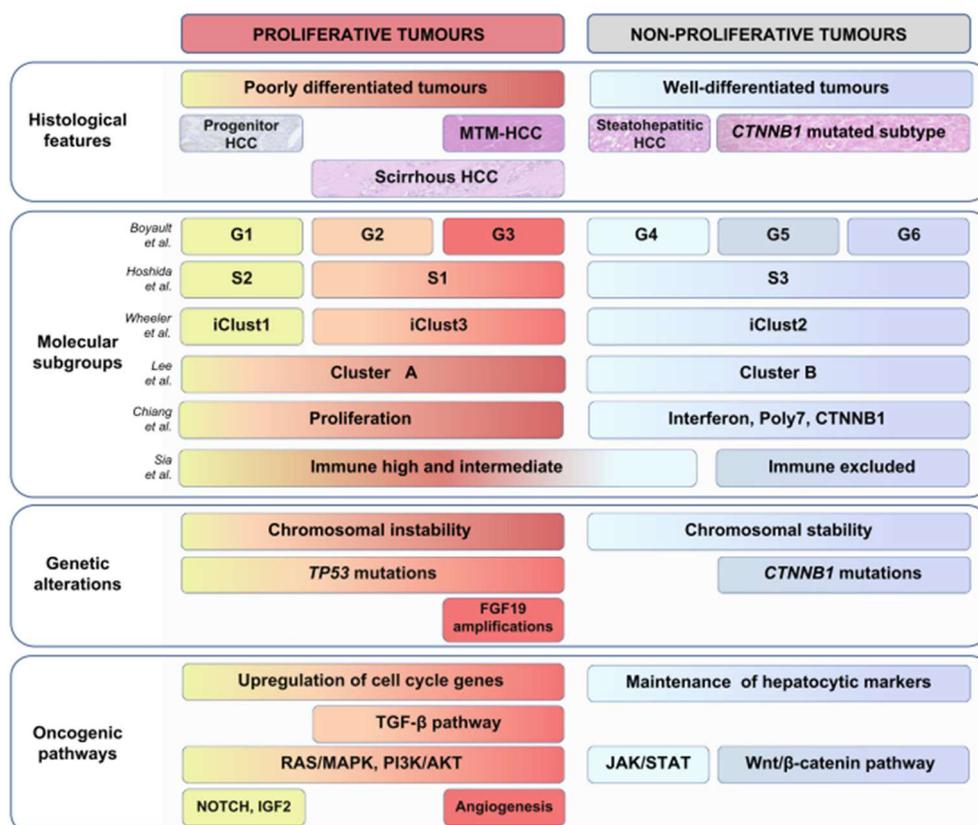


**Abbildung 3: HCC-Subtypen nach Longerich: a makrotrabekuläres HCC, b AFP-Expression, c steatohepatitisches HCC, d klarzelliges HCC, e chromophobes HCC, f lymphozytenreiches HCC; (Originalvergrößerung 200:1) (Longerich, 2020, S. 41)**

Aus molekularer und genomischer Sicht betrachtet ergibt sich eine Klassifizierung in sechs Subgruppen (G1-G6). Die Subgruppe G1 wird mit klarzelliger Morphologie assoziiert und ist durch eine niedrige HBV-Replikation und einen bestimmten Progenitorzellphänotyp gekennzeichnet. G2- und G3-Subgruppen weisen neben makrotrabekulär-massiven vor allem szirrhöse Differenzierungsmuster auf. Sie unterscheiden sich in ihrer HBV-Infektionsbeteiligung (G2: HBV-positiv; G3: HBV-negativ) sowie im Mutationsmuster (G2: TP53-, PIK3CA-Mutationen; G3: TP53-Mutation, CDKNA-Inaktivierung). Die G4-Subgruppe steht in Verbindung mit der steatohepatischen Differenzierung und zeigt eine

JAK/STAT-Aktivierung. G5 und G6 werden mit einem mikrotrabekulären und pseudoglandulären Differenzierungsmuster assoziiert und zeigen aktivierte CTNNB1-Mutationen (Boyault *et al.*, 2007; Désert, Nieto and Musso, 2018; Calderaro *et al.*, 2019).

Einen sehr detaillierten Bezug zwischen klinischen, genetischen und pathohistologischen Merkmalen beschrieben Calderaro *et al.* (2019) im Rahmen eines Reviews, das unter anderem die untenstehende Abbildung enthält (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Übersicht der molekularen Subgruppen einschließlich der Darstellung histologischer Merkmale, transkriptomischer Klassifizierung und genetischen Veränderungen des HCCs (Calderaro *et al.*, 2019, S. 618)**

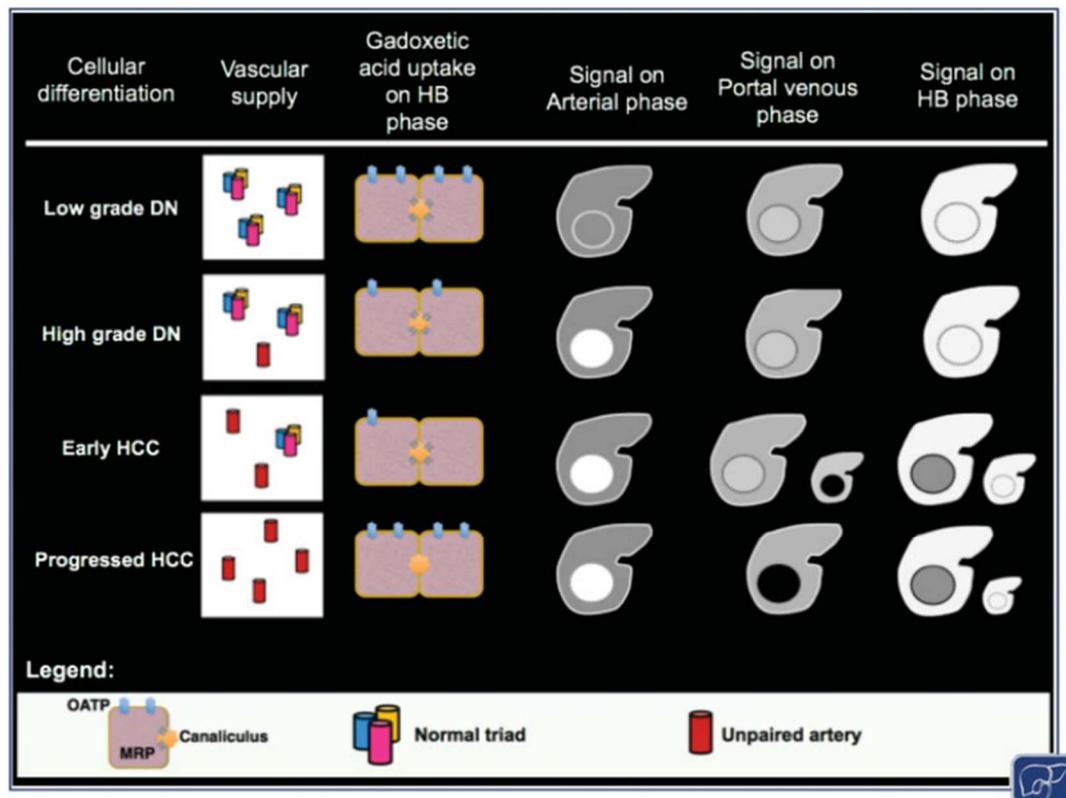
Hiermit soll die Komplexität der unterschiedlichen Einflussfaktoren auf die Heterogenität des HCCs veranschaulicht werden, eine detailliertere Analyse der einzelnen Untergruppen ginge über den Rahmen dieser Arbeit hinaus.

### 1.3.2. Heterogenität in der Bildgebung

Das HCC stellt sich auch in der Bildgebung sehr heterogen dar. Hierbei sind neben verschiedenen Tumoren im selben Patienten, verschiedene Erscheinungsformen innerhalb eines Tumors zu finden und es kann, der Pathohistologie entsprechend, wieder von einer intra- und intertumoralen Heterogenität gesprochen werden (Hectors *et al.*, 2017).

Die nicht-invasive Diagnose eines HCCs stellt für die Radiologie weiterhin eine große Herausforderung dar, da die Größe der Tumore wesentlichen Einfluss auf deren Vaskularisations- und Differenzierungsgrad hat, was sich in einem mehr oder weniger deutlichen, charakteristischen Bildgebungsverhalten äußert. Vor allem bei kleineren Leberherden (< 2 cm) ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen dysplastischem Knoten oder frühem HCC vielfach einzig mit Hilfe der Bildgebung nicht möglich und bedarf der Biopsieentnahme sowie der weiteren histopathologischen Abklärung (Kojiro *et al.*, 2009; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Abhängig vom Stadium der Hepatokarzinogenese, bei der das Zusammenspiel aus zellulärer Differenzierung, Vaskularisation und damit einhergehender Kontrastmittelaufnahme eng korreliert, stellt sich das HCC in der Bildgebung unterschiedlich dar (siehe Abbildung 5). Dabei weisen dysplastische Knoten noch eine große Anzahl von OATP- und MRP-Transportern (engl. Multidrug resistance-associated protein), die für die Aufnahme und Ausscheidung der Gadoxetsäure zuständig sind, auf und erscheinen daher in der hepatobiliären Phase isointens im Verhältnis zum umgebenden Leberparenchym. In frühen und fortgeschrittenen HCCs ist die OATP-Transporteranzahl oftmals vermindert oder fehlend, was sich in einer verminderten Kontrastmittelaufnahme niederschlägt. MRP-Transporter sind hingegen überrepräsentativ vertreten, was ein vermehrtes Ausscheiden des Kontrastmittels aus dem Tumor bedingt und daher in der hepatobiliären Phase ein hypointenses Erscheinungsbild ergibt.



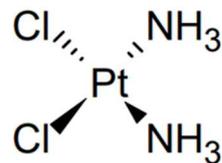
**Abbildung 5:** Korrelation zwischen dem kontinuierlichen Prozess der Hepatokarzinogenese vom low-grade dysplastischen Knoten (low grade DN) bis zum fortgeschrittenen HCC (progressed HCC) inkl. der Veränderung der Gefäßversorgung (Vascular supply) sowie Transporterverteilung (OATP, MRP) und dem Grad der Heterogenität bei der kontrastmittelverstärkten Bildgebung in der arteriellen, portalvenösen und hepatobiliären (HB) Phase (Rimola, 2020, S. 65)

Jedoch weisen 10 - 15 % der HCCs eine entgegengesetzte Transporterverteilung auf (OATP-Erhöhung, MRP-Verminderung) und erscheinen somit in der hepatobiliären Phase hyperintens, also heller im Vergleich zum umgebenden Leberparenchym (Fujita *et al.*, 2020; Rimola, 2020). Die einzelnen Phasen und das dafür typische Kontrastmittelverhalten werden in folgenden Kapiteln genauer erläutert.

## 2. Übersicht verwendeter Substanzen sowie deren pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften

### 2.1. Cisplatin

Cisplatin oder auch *Cis*-Diammindichloridoplatin, dessen Strukturformel in Abbildung 6 dargestellt wird, ist ein weit verbreitetes Chemotherapeutikum, das bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen (u.a. Karzinome, Sarkome, Lymphome und Keimzelltumore) Anwendung findet. Es wurde erstmals im Jahr 1844 von M. Peyrone synthetisiert. Sein großes Potential als Chemotherapeutikum wurde jedoch erst Jahre später erkannt, nachdem Rosenberg *et al.* 1965 in einem Experiment zufällig herausfanden, dass durch bestimmte Elektrolyseprodukte von Platinelektroden die Zellteilung von *Escherichia coli* gehemmt wurde. 1978 wurde Cisplatin von der Food and Drug Administration (FDA) für die Krebstherapie zugelassen (Rosenberg *et al.*, 1965; Shaloam and Tchounwou, 2014).



**Abbildung 6: Strukturformel von Cisplatin**

Der genaue Aufnahmemechanismus von Cisplatin in die Zelle ist noch nicht komplett aufgeklärt. Die Wirkung beruht auf seiner Interaktion mit der DNA von sich schnell teilenden Zellen, wobei Cisplatin nach intravenöser Injektion über die Blutbahn zu den Zellen gelangt. Vermutlich sowohl über passive Diffusion als auch diverse aktive Membrantransporter, wie über den Kupfertransporter 1 (CTR1: engl. copper transporter 1) erfolgt die Aufnahme in die Zellen. Im Zytoplasma wird es aktiviert, indem die Chloridionen von Wassermolekülen (Hydrolyse) verdrängt werden, da die Chloridkonzentration im Zytoplasma geringer ist als die im Blut. Das hydrolysierte Produkt ist ein starkes Elektrophil, das mit jedem Nukleophil wie

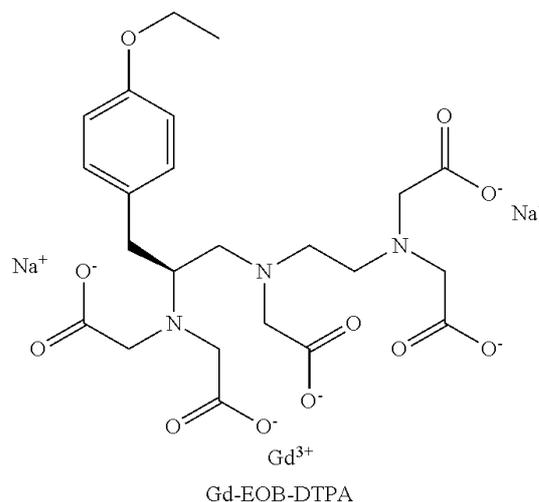
bspw. der DNA, RNA und Proteinen reagieren kann. Insbesondere an das reaktive N7-Zentrum von Purinresten (v.a. Guanin) bindet es, wodurch in Tumorzellen durch die gebildeten Quervernetzungen zwischen beiden (sog. *interstrand crosslinks*) sowie innerhalb desselben DNA-Stranges (sog. *intrastrand crosslinks*) DNA-Schäden verursacht werden und der apoptotische Zelltod eingeleitet wird. Eine Reihe einiger weiterer Mechanismen (u.a. die Cisplatin induzierte Induktion oxidativen Stresses), die den Zelltod einleiten, werden diskutiert (Gonzalez *et al.*, 2001; Ott and Gust, 2006; Shaloam and Tchounwou, 2014).

Obwohl Cisplatin eines der am meisten verwendeten Chemotherapeutika ist, gibt es zwei Hauptprobleme, die seine Anwendung limitieren, nämlich zum einen seine Toxizität (u.a. Nierenschädigung, Taubheit, periphere Neuropathien) und zum anderen die Resistenzbildung von Tumorzellen gegen seine Wirkung. Verschiedene molekulare Mechanismen werden für die Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin vermutet. Diese sind neben einer verstärkten DNA-Reparatur, die veränderte zelluläre Akkumulation, eine gesteigerte Medikamenteninaktivierung sowie seine Neutralisation durch Bindung von Sulfhydrylgruppen von Proteinen wie Glutathion oder Metallothioneinen (Eljack *et al.*, 2014; Amable, 2016). Initial reagieren einige Krebsarten sehr empfindlich auf eine Cisplatintherapie, viele Patienten erleiden jedoch Rezidive, die gegen eine weitere Therapie resistent sind. Die Aufnahme von Cisplatin auf zellulärer Ebene steht im Zusammenhang mit der Tumorbelastung, sodass niedrige intrazelluläre Konzentrationen mit einer schlechteren Reaktion des Tumors auf die Therapie assoziiert werden. Deshalb ist es von großer Bedeutung die Cisplatinaufnahme und Verteilung auf zellulärer Ebene zu betrachten, um herauszufinden welche Therapieformen sich als geeignet erweisen (Amable, Smith and Stephan, 2017).

Bezüglich des unterschiedlichen Therapieansprechens und der Resistenzlage ist es deshalb essenziell zu untersuchen, ob einzelne Tumorzellen eines Tumors gleich oder vergleichbar hohe Cisplatinkonzentrationen enthalten oder, ob einige Zellen eine höhere Konzentration aufweisen als andere. Durch die Möglichkeit mittels LA-ICP-MS Metallkonzentrationen auf zellulärer Ebene zu messen, gilt es zu evaluieren, ob hieraus wichtige Informationen für zukünftige Therapieoptionen generiert werden können.

## 2.2. Gadoxetsäure

Primovist®, das den Wirkstoff Gadoxetsäure (Gd-EOB-DTPA) enthält (Strukturformel siehe Abbildung 7) ist ein leberspezifisches, gadoliniumhaltiges Kontrastmittel, das sowohl die zuverlässige Detektion und Lokalisation als auch die genauere Charakterisierung von Leberläsionen ermöglicht. Es ist als ein hepatozytenspezifisches Kontrastmittel ein sog. „Weißmacher“, da es aktiv von funktionalen Leberzellen aufgenommen wird und zu einem helleren (hyperintens) Erscheinungsbild des Leberparenchyms führt. Im Gegensatz dazu stellen sich Läsionen, in denen keine funktionsfähigen Hepatozyten enthalten sind (bspw. HCCs oder Metastasen) dunkel (hypointens) dar. Ausgeschieden wird es jeweils zu 50 % biliär und renal (Schalhorn, 2008).

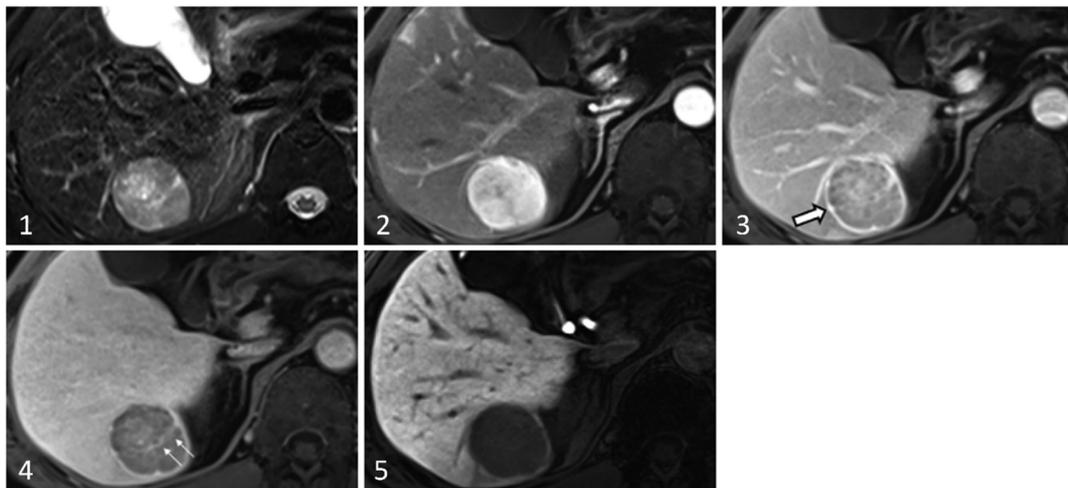


**Abbildung 7: Strukturformel von Primovist® (Platzek and Trentmann, 2013, S. 1)**

Die nachfolgenden Erläuterungen des Kontrastmittelverhaltens gelten innerhalb der einzelnen Phasen auch für die kontrastmittelverstärkte Sonographie und CT. Da in der durchgeführten Studie die MRT als Bildgebungsmodalität verwendet wurde, wird im weiteren Kontext nur darauf eingegangen.

Bei der dynamischen, kontrastmittelverstärkten MRT wird bspw. Primovist® als Bolus intravenös injiziert und zeigt während der arteriellen Phase (Einteilung in früh- und spätarteriell je nach Autor), der portalvenösen Phase, der spätvenösen

Phase (sog. Spätphase) sowie der hepatobiliären Phase ein charakteristisches Perfusionsverhalten in Tumoren und umgebenden Leberparenchym. Typische HCC-Läsionen zeigen aufgrund ihrer Hypervaskularisation und ihrer dadurch verstärkten Durchblutung eine Kontrastmittelanreicherung, ein sog. Hyperenhancement in der spärarteriellen Phase. Aufgrund der fehlenden Kontrastmittelaufnahme von nicht-funktionsfähigen Hepatozyten folgt auf das Hyperenhancement ein Auswaschen, das sog. Wash-out in der portalvenösen und spätvenösen Phase teilweise bis hin zur Kontrastumkehr (siehe Abbildung 8).



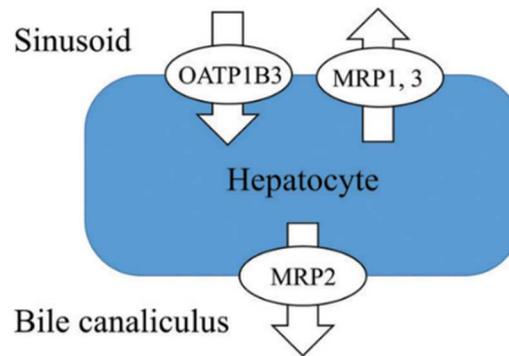
**Abbildung 8: Kontrastmittelverhalten des HCCs in der MRT: (1) T2w-Bildgebung zeigt eine hyperintense Masse; (2) Arterielle Phase mit Hyperenhancement und Wash-out in der (3) portalvenösen und (4) spätvenösen Phase. (3) Kapselverstärkung (breiter Pfeil) und (4) intratumorale fibröse Septen (schmale Pfeile); (5) Hypointense Masse in der hepatobiliären Phase mit Kontrastmittelumkehr (Kim, Joo and Lee, 2019, S. 1020)**

Zu den ergänzenden Merkmalen in der MRT gehören ein hyperintenses Erscheinungsbild auf T2-gewichteten (T2w) Bildern, ein Hypointenses in T1-gewichteter Bildgebung (T1w) sowie ein gelegentlich isointenses Verhalten früher HCCs in der nativen T1-Wichtung. Die Diffusionsbildgebung (DWI, diffusion-weighted-imaging) liefert zusätzliche Informationen mit Hilfe des apparenten Diffusionskoeffizienten (ADC, apparent diffusion coefficient). Hierbei können auf der Grundlage, dass die freie Bewegung von Wassermolekülen durch Zellen eingeschränkt wird, Aussagen über die Zelldichte erfolgen. Durch die Beurteilung

der zufälligen Wasserbewegung in Geweben (sog. Brownsche Bewegung) kann der ADC quantifiziert werden (Meyer, Garnov and Surov, 2018). Im Gegensatz zum physiologischen Lebergewebe weisen maligne Läsionen aufgrund ihrer erhöhten Zelldichte niedrigere ADC-Werte auf (Lincke, Boll and Zech, 2016; Kim, Joo and Lee, 2019).

Primovist® ist neben MultiHance® derzeit das einzige zugelassene hepatozytenspezifische Kontrastmittel in der Europäischen Union. Beide enthalten Gadolinium (Gd) in Form von Gadoxetsäure (Primovist®) und Gadobensäure (MultiHance®) und werden über aktive Transporter in funktionsfähige Hepatozyten transportiert. Das Besondere an Primovist® gegenüber herkömmlichem extrazellulärem Kontrastmittel (nicht hepatozytenspezifisch) ist die Darstellung der Kontrastmittelumkehr in der hepatobiliären Phase ca. 20 min nach Injektion (MultiHance nach ca. 60 min), in der sich der Tumor hypointens im Vergleich zum hyperintens umgebenden Lebergewebe darstellt. Die fehlende Kontrastmittelaufnahme des Tumors spiegelt das Fehlen funktionsfähiger Hepatozyten wider und gilt als Beweis für seine Entdifferenzierung (Chanyaputhipong, Low and Chow, 2011; Lincke, Boll and Zech, 2016).

Einen wichtigen Transporter bei der Gadoxetsäureaufnahme stellt das Organic-Anion-Transporting-Polypeptide 1B3 (OATP1B3) dar. Es wird in den sinusoidalen Membranen der Hepatozyten exprimiert. Transporter, die für den Export zuständig sind, sind auf der sinusoidalen Seite das Multidrug resistance-associated protein (MRP) 1 und MRP3, sowie auf der kanalikulären Seite MRP2 (siehe Abbildung 9). Beim HCC findet eine veränderte OATP1B3-Expression statt. Läsionen ohne funktionierende Hepatozyten weisen in der Regel eine geringe oder gar keine OATP1B3-Expression auf und stellen sich während der Spätphase im Vergleich zum Hintergrundlebergewebe hypointens dar (Van Beers, Pastor and Hussain, 2012; Fujita *et al.*, 2020).



**Abbildung 9: Übersicht der beteiligten Transporter der Gadoxetsäureaufnahme und -abgabe von vitalen Hepatozyten (Fujita *et al.*, 2020, S. 3)**

Problematisch ist nach wie vor, dass nicht alle HCCs diesem typischen Kontrastmittelverhalten folgen und insbesondere kleine HCCs aufgrund ihrer noch nicht ausreichenden Entdifferenzierung kein Hyperenhancement und Wash-out in der MRT zeigen. Eine Früherkennung und Einschätzung dieser untypischen und frühen Läsionen stellt daher einen wichtigen Forschungsansatz für die Leberkrebstherapie dar.

### **3. HCC des Menschen**

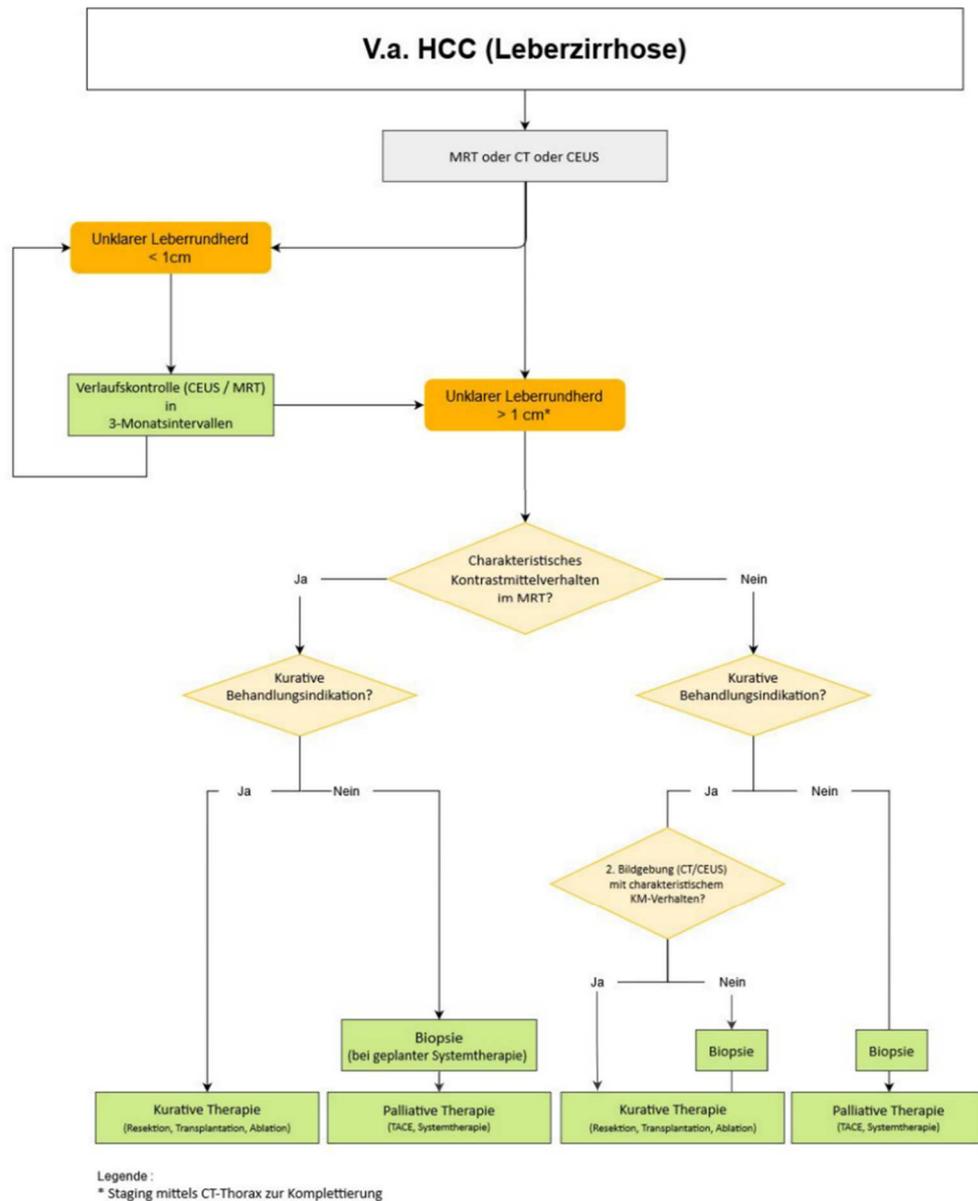
#### **3.1. Diagnosealgorithmus in Deutschland**

Zur Diagnose des HCCs stehen folgende bildgebende Verfahren zur Verfügung. Die Magnetresonanz- (MRT) oder Computertomographie (CT) sowie der Kontrastmittel-Ultraschall (CEUS, contrast-enhanced ultrasound).

Wie in Abbildung 10 dargestellt sollen Läsionen < 1 cm alle drei Monate mittels CEUS oder MRT reevaluiert werden. Läsionen > 1 cm sollen bezüglich ihres Kontrastmittelverhaltens in der kontrastmittelverstärkten MRT (CE-MRT) genauer untersucht werden. Zeigen diese ein für das HCC typisches Verhalten erfolgt entweder ein kurativer Therapieversuch mittels bspw. Resektion, Transplantation oder Ablation oder die Biopsieentnahme und Start einer palliativen Therapieform wie der transarterielle Chemoembolisation (TACE) oder Beginn einer Systemtherapie. Bei nicht typischem Kontrastmittelverhalten in der MRT erfolgt

eine zweite Bildgebung mittels kontrastmittelverstärkter CT (CE-CT) oder CEUS. Bei kurativer Behandlungsindikation und typischem Bildgebungsverhalten in der zweiten Bildgebungsmethode erfolgen kurative Therapieversuche, andernfalls ergibt sich nach bestätigter Biopsie eine palliative Therapieform, wie bereits oben genannt. Die Leberbiopsie sollte ebenso erfolgen, wenn ein Studieneinschluss oder ein individueller Heilversuch diskutiert werden. Sie sollte mittels einer 16 - 18 Gauge Biopsienadel gewonnen werden, um genug Gewebe zur Typisierung hochdifferenzierter HCCs sowie für eventuell zusätzliche immunhistochemische oder molekularpathologische Untersuchungen zu gewinnen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Die European Association for the Study of the Liver (EASL) und die American Association for the Study of the Liver Diseases (AASLD) empfehlen ebenfalls die CE-CT und CE-MRT gegenüber der CEUS als zu verwendende Technik zur Diagnosestellung des HCCs, da der Ultraschall im großen Maße von der Untersucherexpertise, wie auch von der Tumorlokalisation oder durch eine fehlende Eindringtiefe der Ultraschallwellen bei ausgeprägter Fettleibigkeit der Patienten beeinflusst wird (Galle *et al.*, 2018; Heimbach *et al.*, 2018).



**Abbildung 10: Diagnosealgorithmus des HCCs im Hintergrund einer Leberzirrhose nach neuer Leitlinie 2021 (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021, S. 49)**

### 3.2. Staging-Systeme und Therapieoptionen

Es existieren weltweit verschiedene Staging-Systeme, wie bspw. das Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Staging, das Cancer of the Liver Italian Program (CLIP), das Hong-Kong Liver Cancer (HKLC) Staging, der Chinese University Prognostic Index (CUPI) oder das Japan Integrated Staging (JIS). Von der EASL

und AASLD wird die BCLC-Klassifikation empfohlen, da sie wiederholt länderübergreifend validiert wurde und eine Bewertung von Tumorlast, Leberfunktion und Patientenstatus mit Therapieoptionen und der Überlebenszeit kombiniert (Galle *et al.*, 2018; Marrero *et al.*, 2018).

Was im Folgenden als Standardtherapie erläutert wird, richtet sich nach dem Leitlinienprogramm Onkologie 2021 sowie nach der EASL-Leitlinie. Das BCLC-Staging untergliedert HCCs im Hintergrund einer Zirrhose in verschiedene Stadien (Einteilung nach dem Leitlinienprogramm Onkologie in Stadium A1, A2, B, C und D sowie 0, A, B, C, D modifiziert nach der EASL), wobei Stadium A und 0 kleine Herde bei erhaltener Leberfunktion umfassen. Bei Stadium B zugeordneten Läsionen handelt es sich um multinoduläre, nicht-resektable HCCs, Stadium C-Läsionen weisen bereits eine Metastasierung auf und eine End-Stage Leberfunktion charakterisiert Stadium D. Mögliche Standardtherapieoptionen sind im Stadium A bzw. 0 neben Ablationsverfahren, die Resektion, die TACE mit Ablation oder die Lebertransplantation. Im Stadium B wird die Chemoembolisation empfohlen. Im Stadium C stehen lediglich Systemtherapien (Erstlinientherapie: Atezolizumab-Bevacizumab; bei Vorliegen von Kontraindikation oder Unverträglichkeiten Sorafenib oder Lenvatinib; Zweitlinientherapie: Regorafenib oder Cabozantinib oder Ramucirumab) zur Verfügung und im Stadium D steht der Best Supportive Care im Mittelpunkt der Therapie (Galle *et al.*, 2018; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

### **3.2.1. Transarterielle Chemoembolisation im BCLC Stadium B**

Die TACE ist die am weitesten verbreitete Therapiemethode bei Patienten im BCLC Stadium B mit nicht resektablem HCC (Galle *et al.*, 2018). Sie basiert auf einer selektiven vaskulären Embolisation, der den Tumor versorgenden Arterien in Kombination mit der lokalen Chemotherapeutikainjektion von v.a. Antrazyklinen (bspw. Doxorubicin oder Epirubicin) oder Platinderivaten, welche zu hohen intratumoralen Konzentrationen und starken zytotoxischen Effekten führen. Als Embolisat findet häufig Lipiodol Verwendung. Ziel ist eine komplette Devaskularisation der Tumore, unter Schonung des gesunden Lebergewebes. Von großer Bedeutung für den Therapieerfolg ist die individuelle Vaskularisation jedes einzelnen Tumorherds, da eine selektive arterielle Tumorversorgung über einzelne Hauptgefäße, sog. Feeder nach einer Embolisation deutlich bessere Ergebnisse

erwarten lässt, als schwach vaskularisierte Tumore. Darüber hinaus ist mit umso weniger Nebenwirkungen zu rechnen, je selektiver die TACE erfolgen kann. Die Intervention sollte mehrfach erfolgen, solange ein Therapieansprechen zu verzeichnen ist und solange hypervaskularisierte Tumorbereiche darstellbar sind (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

### **3.3. TNM-Staging**

Die Tumor Nodus Metastase (TNM)-Klassifikation soll gemäß der aktuellen Auflage (aktuell 8. Auflage von 2014) erfolgen. Relevant sind hierbei Größe und Anzahl der Tumorherde sowie auch eine evtl. Gefäßinvasion (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Sie verwendet die Parameter T (Tumorgröße und -anzahl: T1, T2, T3a, T3b, T4), N (regionaler Lymphknotenbefall: N0, N1) und M (Metastasierung: M0, M1) zum Staging der Erkrankung und ermöglicht die Einteilung der Patienten nach Tumormerkmalen (siehe Abbildung 11). Im Falle des HCCs können jedoch das klinische Ergebnis in Bezug auf die Rezidivrate und das Gesamtüberleben von Patienten im gleichen TNM-Stadium signifikant unterschiedlich ausfallen. Deshalb werden enorme Anstrengungen unternommen neue Parameter und Biomarker mit präziserem prognostischem Wert zu entwickeln und zu etablieren. Erschwert wird dieser Prozess jedoch durch die extreme Heterogenität des HCCs (Chan *et al.*, 2013; Petrizzo and Buonaguro, 2016).

Stage	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIa	T3a	N0	M0
IIIb	T3b	N0	M0
IIIc	T4	N0	M0
IVa	Any T	N1	M0
IVb	Any T	Any N	M1

T1: single tumor without vascular invasion

T2: single tumor with vascular invasion or multiple tumors, none > 5 cm

T3a: multiple tumors > 5 cm

T3b: tumor involving a major branch of the portal or hepatic vein

T4: tumor with direct invasion of adjacent organs other than gallbladder or with perforation of visceral peritoneum

N0: no regional lymph node metastasis

N1: regionallymph node metastasis

M0: no distant metastasis

M1: distant metastasis

**Abbildung 11: TNM-Klassifikation des HCCs (Petrizzo and Buonaguro, 2016, S. 2, Table 1)**

Aus diesem Grund sind neben den bereits bestehenden diagnostischen Gewebe-Biomarkern die Entwicklung weiterer serologischer wie auch bildgebender prädiktiver und prognostischer Biomarker Gegenstand aktueller Forschung.

## 4. Bildgebung

### 4.1. Magnetresonanztomographie

Die MRT ist aufgrund ihres hohen Weichteilkontrasts ein wichtiges Instrument zur Detektion und Charakterisierung fokaler Leberläsionen (FLL). Darüber hinaus bietet sie Möglichkeiten verschiedener funktioneller Bildgebungsverfahren, unter Verwendung hepatozytenspezifischer Kontrastmittel, diffusionsgewichteter Sequenzen (diffusion weighted imaging, DWI) oder der Perfusionsbildgebung (dynamic contrast enhanced, DCE) und dies ohne jegliche Strahlenexposition der Patienten. Die DCE-MRT wird zur genaueren Charakterisierung des HCCs, zur Einschätzung des Therapieansprechens und zur Prognoseeinschätzung eingesetzt. Grundlage hierfür ist die Aufnahme mehrerer Bildserien, i.d.R. T1w-Sequenzen,

wodurch der Tumor vor, während und nach erfolgter Gadoliniuminjektion im Abstand weniger Sekunden abgebildet wird. Durch das Muster und die Geschwindigkeit der Kontrastmittelanflutung können Rückschlüsse auf pathohistologische Veränderungen der Mikrozirkulation gezogen werden, was im Falle des HCCs von großem Interesse ist, da im Zuge der Blutgefäßneubildung der histologische Malignitätsgrad fortschreitet (Ippolito *et al.*, 2018).

Das Kontrastmittel gelangt im Tumorgewebe vom intravaskulären Raum in den Extrazellulärraum, was zu einem signifikanten Signalanstieg in der T1w-MRT führt. Die DCE-Auswertung kann semiquantitativ oder quantitativ erfolgen und erzeugt Parameter, die mit der tumoralen Angiogenese korrelieren (Chen and Shih, 2014). Darüber hinaus können in der Bildgebung Pfortaderthrombosen detektiert werden. Die Einordnung eines Pfortaderthrombus als maligne ist jedoch schwierig, da Kriterien für die Beurteilung von Thrombosen (u.a. Nachweis intraluminalen Materials, Pfortaderdistension oder ein fehlendes Flusssignal) sowohl für benigne als auch für maligne Thrombosen gelten. Maligne Thrombosen zeigen ein dem HCC ähnliches Enhancement und Wash-out und weisen aufgrund ihrer erhöhten Zelldichte erniedrigte ADC-Werte auf (Lincke, Boll and Zech, 2016).

#### **4.2. Digitale Subtraktionsangiographie**

Die digitale Subtraktionsangiographie (DSA) ist ein invasives Verfahren bei dem selektiv die Leberarterie kanüliert wird und nicht nur deren Darstellung, sondern auch die Darstellung der Anzahl und Größe, der den Tumor versorgenden Blutgefäße ermöglicht. Die DSA aus verschiedenen Winkeln dient somit dem Nachweis arterieller Feeder und ist die Routinemethode, die bei der TACE angewandt wird (Abdelsalam, Emara and Hassouna, 2022). Sie liefert genaue Informationen über vaskuläre Veränderungen und anatomische Beziehungen zwischen Lebertumoren und umgebenden Gefäßen und macht die Beurteilung einer Pfortaderinfiltration, welche prognostische und therapeutische Konsequenzen hat, möglich (Zhou *et al.*, 2020).

## 5. Pathohistologie und Immunhistochemie (IHC)

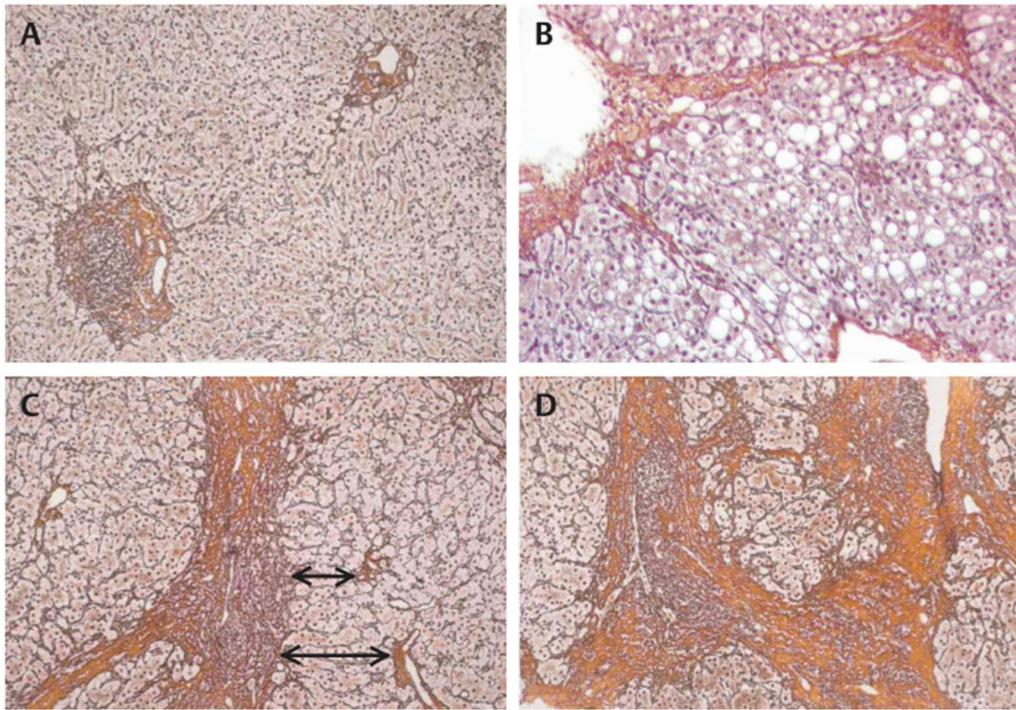
### 5.1. Pathohistologie

#### 5.1.1. Fibrose und Staging-Systeme

Leberkrebs entwickelt sich überwiegend (70 - 90 %) vor dem Hintergrund einer Leberfibrose, die sich über die Leberzirrhose schrittweise zum HCC entwickelt. Die Fibrose entsteht durch kontinuierliche Schädigung der Leber, welche größtenteils aus parenchymatösen (80 %, entsprechen Hepatozyten) sowie nicht-parenchymatösen (20 %) Zellen besteht. Die Hepatozyten stellen das Ziel hepatotoxischer Wirkstoffe dar. Werden sie geschädigt, werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Fibrosemediatoren freigesetzt, die die Aktivierung weiterer Zellen induzieren. Dazu zählen unter anderem hepatische Sternzellen (HSCs), phagozytische Kupfer-Zellen (KCs) und lebersinusoidale Endothelzellen (LSECs), welche bei der Fibroseentwicklung wichtige Vermittler darstellen (O'Rourke *et al.*, 2018).

Zur Beschreibung des Ausmaßes der Fibrose bzw. der Architekturstörung einer chronisch entzündeten Leber soll ein Scoringssystem verwendet werden. Größtenteils finden Systeme nach Desmet *et al.*, Batts und Ludwig, Ishak *et al.* (modifizierter Fibrosescore) und der METAVIR-Fibrosescore (nur bei Hepatitis C bedingter Fibrose) Anwendung. Die Verwendung des 5-stufigen Scores nach Desmet *et al.* (abgeleitet nach Scheuer) wird empfohlen, da es ein einfach durchführbares System darstellt und gut reproduzierbar ist (Schirmacher, Fleig and Dienes, 2004).

Nach Desmet *et al.* weist Grad 0 keine Fibrose auf und es findet sich keine Faservermehrung. Bei Grad 1 (siehe Abbildung 12 A) existiert eine milde Fibrose, wobei sich portale Faservermehrungen zeigen. Es kommt aber zu keiner Septenbildung. Grad 2 (siehe Abbildung 12 B) zeigt eine mäßige, inkomplette oder komplette Septenbildung und portoportale Fibrose ohne Architekturstörung, wohingegen Grad 3 (siehe Abbildung 12 C; Doppelpfeile zeigen eine deutlich reduzierte portozentrale Distanz) eine schwere septale Fibrose mit kompletten Septen und Architekturstörung und Grad 4 (siehe Abbildung 12 D) eine Zirrhose aufzuweisen haben (Scheuer, 1991; Desmet *et al.*, 1994; Schirmacher, Fleig and Dienes, 2004).



**Abbildung 12: Fibrose-Staging (Leber mit chronischer Hepatitis, modifizierte Gomori-Färbung) mit (A) Stadium 1, (B) Stadium 2 und (C) Stadium 3 Fibrose sowie (D) Stadium 4 Zirrhose nach Desmet und Scheuer (Schirmacher, Fleig and Dienes, 2004, S. 182)**

Die Zirrhose stellt die Reaktion der Leber auf chronische Schädigung dar. Während ihrer Entwicklung entstehen Regeneratknötchen, die von fibrösen Septen umgeben werden. Sie stellt das Endstadium der Fibrose, die eine Einkapselung oder den Ersatz geschädigten Gewebes durch Narbengewebe beschreibt, dar (Schuppan and Afdhal, 2008).

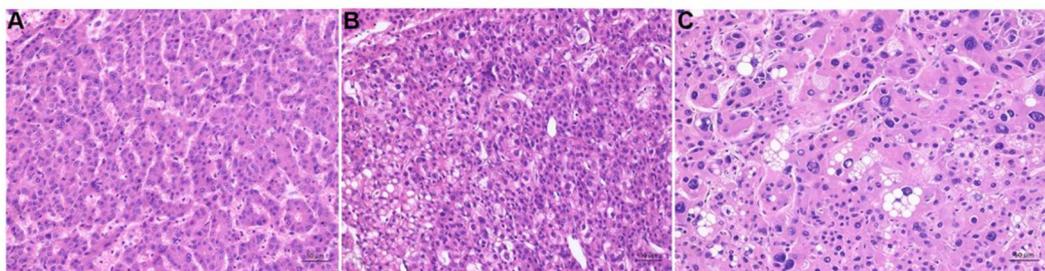
### 5.1.2. Übersicht der histologischen Grade des humanen HCCs

Das am häufigsten verwendete Grading des humanen HCCs ist neben der WHO-Klassifikation im Buch “Classification of Tumours of the Digestive System” das Grading nach Edmondson-Steiner (ES). Tabelle 2 soll eine Übersicht über die in den beiden Quellen genannten histologischen Merkmale (histologischer Grad, Architektur) geben (Martins-Filho *et al.*, 2017).

**Tabelle 2: Übersicht des HCC-Gradings nach ES und WHO**

	<b>Grad</b>	<b>Architektur</b>
<b>ES</b>	GI - hoch differenziert	Tumorzellen schwierig von denen des hepatozellulären Adenoms (HCA) zu differenzieren
	GII - gut differenziert	trabekulär, häufig azinäre Anordnung
	GIII - mäßig differenziert	Verdrehung der Trabekel, azinäre Anordnung seltener als bei Grad II
	GIV - schlecht differenziert	medulläres Muster, weniger trabekulär, selten azinäre Anordnung
<b>WHO</b>	G1 - gut differenziert	schmaltrabekuläres Muster, häufig azinäre Strukturen
	G2 - mäßig differenziert	pseudoglanduläres Muster, trabekuläre (drei oder mehr Zelllagen) und azinäre Anordnung
	G3 - schlecht differenziert	solides Muster

Daneben existieren noch weitere Grading-Systeme wie bspw. das Grading nach Nzeako *et al.* und das International Union Against Cancer (UICC) Grading, welche weniger Anwendung finden. Ein einheitliches Grading-System, das weltweit verwendet wird, existiert aktuell nicht. Das WHO-Grading basiert auf der HE-Färbung und vergleicht die Differenzierung der Tumorzellen (gut, mäßig, schlecht) mit der von gutartigen Hepatozyten in einem dreistufigen System (siehe Abbildung 13). Undifferenzierte Tumore sind davon ausgeschlossen, da sie keinen eindeutigen Beweis für das Vorliegen eines HCCs liefern. Die intratumorale Heterogenität bezüglich des Grades einiger HCCs kann deren Einstufung deutlich erschweren. Hierbei kann der vorherrschende oder der schlechteste Grad angegeben werden, da dieser tendenziell die Prognose bestimmt (Gisder, Tannapfel and Tischoff, 2022).



**Abbildung 13: Histologisches Grading des HCCs nach WHO-Klassifikation; (A) gut differenziertes, (B) mäßig differenziertes und (C) schlecht differenziertes HCC (Gisder, Tannapfel and Tischoff, 2022, S. 8)**

Das Grading nach ES stellt ein vierstufiges System dar und basiert auf zytologischen und histologischen Parametern wie Kern-Zytoplasma-Verhältnis, Azidophilie- und Chromatingehalt, Gallebildung und Architektur (Solaß and Tannapfel, 2013). Beim G1 HCC ähneln die Tumorzellen reifen Hepatozyten mit minimaler bis leichter Atypie. Dieses muss gegebenenfalls von hepatozellulärem Adenom (HCA) und dysplastischem Knötchen (beides gutartige Veränderungen) abgegrenzt werden. G2 HCCs weisen dagegen in der HE-Färbung eindeutig bösartige Charakteristika auf. Die Morphologie deutet aber noch stark auf eine hepatozelluläre Differenzierung hin. G3 HCCs stellen sich in der HE-Färbung ebenfalls eindeutig als bösartige Knoten dar. Ihre Morphologie entspricht aber einem breiten Spektrum schlecht differenzierter Karzinome, weshalb es zur finalen Diagnosestellung meist zusätzlicher immunhistochemischer Färbungen bedarf (WHO, 2019; Gisder, Tannapfel and Tischoff, 2022).

35 % der HCCs können über die bestehenden Grading-Systeme hinaus in die folgenden acht Subtypen (Übersicht siehe 1.3.1.), die alle bis auf den fibrolammelären Typ nur in der zirrhotischen Leber auftreten können, klassifiziert werden:

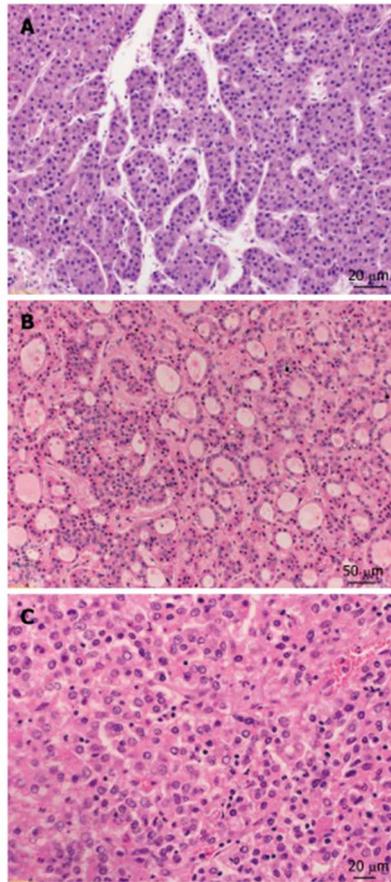
1. Das steatohepatische HCC ist der häufigste aller Subtypen. Er weist typische Merkmale einer Steatohepatitis, wie das Vorhandensein von Fettvakuolen und eine intratumorale Stromareaktion und Entzündung auf und ist häufig mit einem metabolischen Syndrom assoziiert.
2. Das klarzellige HCC stellt den zweithäufigsten Subtyp dar. Seine Tumorzellen zeigen größtenteils eine klare Zellmorphologie mit hellem Zytoplasma aufgrund von Glykogeneinlagerungen und zeigen nur geringe Kernatypien.
3. Das makrotrabekuläre HCC ist mindestens zu 50 % von einem makrotrabekulären Wachstum geprägt und ist meist mit einer schlechten Prognose verbunden.
4. Das szirrhöse HCC weist eine dichte intratumorale Fibrose von mehr als 50 % auf.
5. Das chromophobe HCC hat ein helles Zytoplasma mit angedeuteten Zellgrenzen.
6. Das fibrolammeläre HCC tritt bei jüngeren, vorwiegend weiblichen Patientinnen (Durchschnittsalter 25 Jahre) und nur in nicht-zirrhotischer

- Leber auf. Es finden sich vermehrt große, eosinophile Tumorzellen mit auffälligen Zellkernen sowie eine dichte intratumorale Fibrose.
7. Das neutrophilenreiche HCC kommt vorwiegend bei älteren Menschen vor, weist eine signifikante neutrophilenreiche Entzündung auf und kann sarkomatoide Bereiche enthalten.
  8. Das lymphozytenreiche HCC enthält in den meisten Gesichtsfeldern der HE mehr Lymphozyten als Tumorzellen, welche als Stränge in einem dichten lymphoiden Stroma liegen (WHO, 2019; Gisder, Tannapfel and Tischoff, 2022).

Gemäß der kürzlich aktualisierten S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome sollte die Typisierung des HCCs unter Berücksichtigung der Subtypen nach der aktuellen WHO-Klassifikation (5. Ausgabe der WHO-Klassifikation der Tumoren des Verdauungstraktes) geschehen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

### **5.1.3. Wachstumsmuster des HCCs nach WHO**

HCCs zeigen drei grundlegende Wachstumsmuster: das trabekuläre, das solide und das pseudoglanduläre Muster (siehe Abbildung 14). Das trabekuläre HCC kann in ein mikro- (< 10 Zellreihen) und ein makrotrabekuläres (> 10 Zellreihen) HCC unterteilt werden, wobei letzteres mit einer schlechten Prognose assoziiert wird. Neben dem soliden und pseudoglandulären HCC stellt das trabekuläre HCC das häufigste Wachstumsmuster dar. In aller Regel liegen gemischte Wachstumsformen innerhalb eines Tumors vor (Schlageter *et al.*, 2014; WHO, 2019; Gisder, Tannapfel and Tischoff, 2022). Im progredienten HCC liegt ein expansives und infiltratives Wachstumsmuster mit vollständiger Neovaskularisation unpaarer Arterien und möglicherweise eine vaskuläre Infiltration vor. Es sind i.d.R. alle klassischen Wachstumsmuster vorzufinden. Meist umgibt den Tumor eine Kapsel und es verlaufen bindegewebige Septen durch das Parenchym (Schlageter *et al.*, 2014).



**Abbildung 14: Typische Wachstumsmuster des HCCs: (A) Trabekulär, (B) pseudoglandulär und (C) solide (Schlageter et al., 2014, S. 15958)**

#### **5.1.4. Pathohistologische Einteilung und Wachstumsmuster des HCCs bei Nagetieren**

Das HCC-Grading bei Versuchstieren erfolgt in Anlehnung an das humanmedizinische Grading. Meist wird das Grading nach ES in einem Dreistufen-System (G1-G3) verwendet (Groß *et al.*, 2015; Kaissis *et al.*, 2020).

Die Wachstumsmuster werden bei der Ratte in ein trabekuläres, ein glanduläres (azinäres) und ein solides Wachstumsmuster eingeteilt, wobei in einem Tumor häufig mehrere Muster vorzufinden sind. Bei der Maus findet sich zusätzlich noch das adenoide Muster. Der trabekuläre Typ besteht aus gut differenzierten Hepatozyten, die Trabekel aus mehreren Zellschichten bilden und sich mit Sinusoiden, die erweitert sein können (sinusoidale Dilatation) abwechseln. Beim glandulären Muster bilden neoplastische Hepatozyten vorwiegend eine einzige

Schicht um einen zentralen Raum herum, wobei die Azinusstruktur von sehr kleinen Bereichen bis hin zu riesigen Zysten reichen kann. Der glanduläre Anteil macht meist weniger als 50 % des Tumors aus. Der restliche Anteil ist von trabekulärer oder solider Architektur durchsetzt. Beim soliden HCC sind die Zellen meist schlecht differenziert, manchmal spindelförmig. Es finden sich zahlreiche Mitosen, die auch bizarr aussehen können. Im Gegensatz zu den oft thrombosierten Gefäßen mit unreifen Gefäßstrukturen stellt sich das Stroma meist unauffällig dar (Thoolen *et al.*, 2010).

Neben den oben genannten Wachstumsmustern sind noch die sog. FCAs (engl. Focus/Foci of cellular alteration) zu nennen. Sie werden als potenzielle Vorläuferläsionen im Prozess der Hepatokarzinogenese angesehen, da sie eine lokalisierte Hepatozytenproliferation darstellen, die sich phänotypisch vom umgebenden Leberparenchym unterscheidet. Diese präneoplastischen Läsionen finden sich vorwiegend bei älteren Ratten, ebenso wie im chemisch induzierten Tierversuchsmodell. Welche Bedeutung derartigen Läsionen bei der Entwicklung von Malignität zugeschrieben werden kann, muss in zukünftigen, vergleichenden Studien zwischen proliferativen FCAs bei Ratten und Menschen genauer untersucht werden (Thoolen *et al.*, 2012).

## **5.2. Immunhistochemie**

Immunhistochemische Färbungen unterstützen Pathologen bei der definitiven Diagnosestellung, die alleinig mit histologischen Färbungen wie bspw. der HE-Färbung insbesondere bei Lebertumoren aufgrund deren großer Heterogenität oftmals nicht möglich ist. Dabei haben sich mehrere immunhistochemische Marker als nützlich erwiesen, wobei allen Markern besondere Stärken und Schwächen bezüglich deren Sensitivität und Spezifität zugeschrieben werden können. Grundlegend basiert die Immunhistochemie auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion (Chan and Yeh, 2010), wobei bestimmte (in diesem Fall CD31-Endothelzell-typische) Antigene an den gefärbten Zellen nachgewiesen werden.

### **5.2.1. Immunhistologische, endotheliale Marker**

Es existieren verschiedene Endothelzellmarker, die in experimentellen Studien für die Gefäßdarstellung und zur Mikrogefäßquantifizierung im HCC verwendet

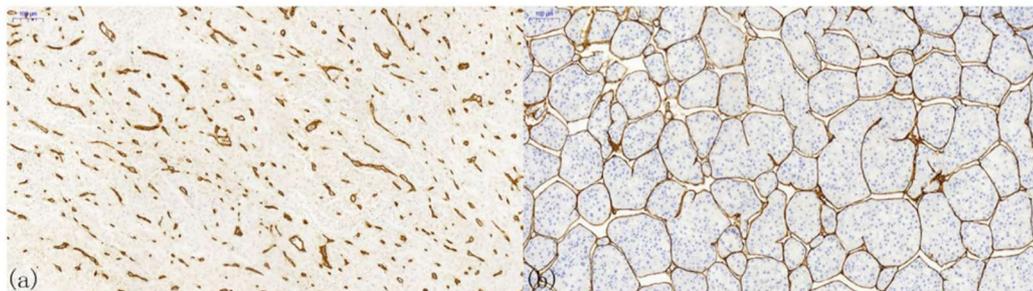
werden. Am häufigsten sind dies das Faktor-VIII-related Antigen (auch von Willebrand Faktor genannt (vWF)), CD34, CD31 sowie CD105 (engl. Cluster of Differentiation 34, 31, 105). Den wohl spezifischsten Marker für Endothelzellen stellt der vWF dar. Das HCC stellt sich häufig stark positiv dar, wohingegen in der physiologischen Leber nur vereinzelt positive Reaktionen von vaskulären Endothelzellen im Portalbereich verzeichnet werden. Physiologische hepatische Sinusoide exprimieren gar keinen vWF. In der zirrhotischen Leber bei chronischer Hepatitis hingegen können auch positive Reaktionen auftreten. CD31 ist Bestandteil von Endothelzellen, wird aber auch auf der Oberfläche anderer Zellen (bspw. Makrophagen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Plasmazellen und Thrombozyten) exprimiert. Kreuzreaktionen mit Plasmazellen sind möglich. CD34 ist der Marker, der am häufigsten zur Gefäßquantifikation verwendet wird, da er insbesondere in vaskulären Endothelzellen und in der Leber nur in geringen Mengen im Pfortaderbereich vorkommt. CD105 kann im Gegensatz zu CD31 und CD34 zwischen ruhenden und proliferierenden Blutgefäßen differenzieren. Jedoch konnte sich seine praktische Anwendung im Vergleich zu anderen Endothelzellmarkern aufgrund falsch negativer Ergebnisse bis dato nicht durchsetzen (Zhang, Wu, *et al.*, 2020).

In der klinischen Praxis werden zum einen Marker wie Arginase-1 (Arg-1), Hepatocyte paraffin 1 (Hep Par 1), polyclonal carcinoembryonic antigen (pCEA) und CD10 als Marker für hepatozelluläre Differenzierung sowie zum anderen Glypican-3 (GPC-3), Heat shock protein 70 (HSP), Glutamine synthetase (GS),  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) und CD34 als Marker zur Detektion bösartiger Hepatozyten verwendet. Dabei zeigt Arg-1 eine hohe Spezifität und die höchste Sensitivität beim HCC generell (> 90 %) sowie eine höhere Sensitivität auch in schlecht differenzierten HCCs und dem szirrhösen Subtyp als Hep Par 1 (Choi and Kakar, 2017; Takahashi *et al.*, 2021). Hep Par 1 hat eine Spezifität und Sensitivität von über 80 %, wobei seine Verwendung mit Einschränkungen verbunden ist. Zum einen wegen seiner geringen Sensitivität für schlecht differenzierte HCCs und zum anderen, weil andere Tumore wie Adenokarzinome oder seltenere hepatoide Karzinome anderer Organe eine Hep Par 1-Positivität zeigen können (Takahashi *et al.*, 2021). GPC-3 weist lediglich eine Sensitivität im gut differenzierten HCC von 56 - 62 %, beim mäßig differenzierten HCC immerhin von 85 - 89 % und im szirrhösen HCC von 79 % auf. Invers hat pCEA eine hohe Sensitivität für gut

(92 %) und mäßig (88 %) differenzierte HCCs, jedoch nur eine geringe Sensitivität für schlecht differenzierte (54 %) und szirrhöse (37 %) HCCs. Durch die Kombination von GPC-3 und Arg-1 können die meisten schlecht differenzierten und szirrhösen HCCs diagnostiziert werden. In der Regel kann das HCC mit Hilfe zweier hepatozellulärer Marker (Arg-1 und Hep Par-1 oder GPC-3) sowie zwei zusätzlichen Markern (CK19 und MOC-31) zur Abgrenzung vom hepatozellulären Adenokarzinom von metastasierten Tumoren abgegrenzt werden. Eine Kombination der verfügbaren IHC-Färbungen ist zur definitiven Diagnosestellung unerlässlich (Choi and Kakar, 2017).

### 5.2.2. Gefäßmorphologie bei immunhistochemischen Färbungen

Die sog. Kapillarisierung, also die positive Färbung der Sinusoide gegen bspw. CD31- oder CD34-Antikörper, ist ein charakteristisches Merkmal des HCCs, das auf eine erhöhte Expression von beiden Endothelzellmarkern zurückzuführen ist (Bösmüller *et al.*, 2018). Bei der Kapillarisierung entwickeln sich hepatische Sinusoide in Sinusoide mit breiteren und kontinuierlichen Endothelzellen mit geringerer Fenestration. Zwei klassische Morphologien, nämlich kapillar- und sinusoidähnliche Mikrogefäße (siehe Abbildung 15) treten bei diesem Vorgang auf.

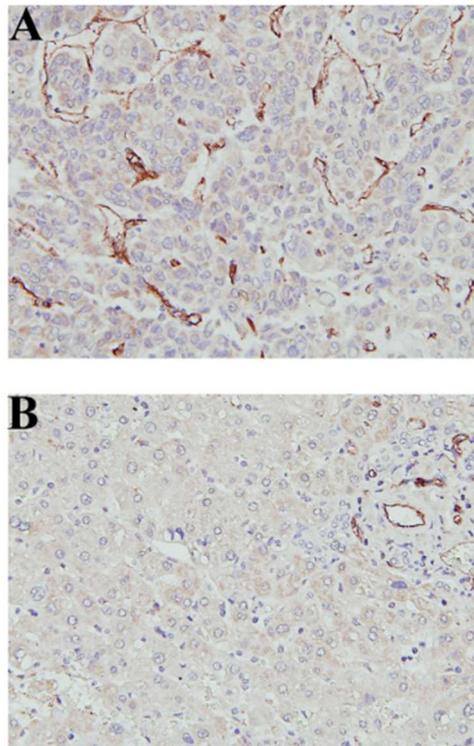


**Abbildung 15: Muster von Mikrogefäßen beim HCC in der IHC: (a) kapillarähnliche und (b) sinusoidähnliche Mikrogefäße (Zhang et al., 2020, S. 5)**

Erstere sind sehr kleine, verstreute Kapillaren, die kein oder ein nur sehr enges Lumen besitzen, wohingegen Zweitere durchgehende Verzweigungen und ein größeres Lumen aufweisen (Zhang, Wu, *et al.*, 2020). Durch die zunehmende Kapillarisierung wird die Diffusionsstrecke zwischen Blut und Hepatozyten immer

weiter verlängert, was ausschlaggebend für den progressiven Funktionsverlust der zirrhotischen Leber ist (Bahr and Manns, 1999).

Chen *et al.* (2013) zeigten in ihrer Studie, dass HCCs in der CD31-Färbung im Vergleich zum umgebenden Leberparenchym eine deutlich erhöhte Angiogenese (siehe Abbildung 16) aufwiesen.



**Abbildung 16: CD31 eines (A) HCCs und (B) des umgebenden Leberparenchyms (Chen *et al.*, 2013, S. 17540)**

Qian *et al.* (2018) verglichen die CD31 und CD105 Expression von 90 HCCs und fanden heraus, dass alle Tumorproben eine CD31, jedoch 39 davon keine CD105-Expression aufwiesen mit der Schlussfolgerung, dass CD105 vermeintlich von schlecht differenzierten HCCs weniger oder überhaupt nicht exprimiert wurde.

In einer experimentellen Studie zur Quantifizierung der Neovaskularisation in einem Xenograft Tumormausmodell verglichen Wang *et al.* (2008) CD31 und vWF-IHCs. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass für beide Marker eine signifikante Korrelation zwischen Gefäßquantifikation und Färbeintensität festzustellen war.

Dabei war CD31 gegenüber vWF als Marker für die Angiogenese unter optimalen Bedingungen überlegen, da durch ihn auch kleinere Gefäße intensiver und zahlreicher angefärbt wurden.

### 5.2.3. Methoden zur Quantifizierung der Tumervaskularisation

Es existieren verschiedene Methoden zur Quantifizierung der Gefäßdichte von Tumoren. Die am längsten und häufigsten verwendete Methode ist die Messung der Microvessel density (MVD). Die MVD war in den vergangenen 30 Jahren die Standardmethode zur Messung der Angiogenese, wobei im Falle des HCCs ihr prädiktiver Wert für die Prognose aufgrund seines hohen Heterogenitätsgrades umstritten ist (Vermeulen *et al.*, 1996; Zhang, Wu, *et al.*, 2020).

Zur Bestimmung der MVD konnte bis dato kein einheitliches Verfahren etabliert werden. Es gibt verschiedene Methoden, die sich auf einzelne Hotspots oder ROIs innerhalb des Tumors konzentrieren, wie bspw. die Weidner- oder die Chalkley-Methode. Bei der Weidner-Methode (1991) erfolgt nach der Identifizierung einiger Hotspots mit der höchsten Blutgefäßdichte die Zählung der Umrisse, der mit immunhistochemischen Routineverfahren angefärbten Blutgefäßwände und die Berechnung der Anzahl der Mikrogefäße pro Quadratmillimeter (mm<sup>2</sup>). Die Chalkley-Methode wird auch Point-Overlap-Morphometrie genannt und basiert auf der Theorie systematischer Zufallsstichproben. Sie erfordert, ebenso wie die Weidner-Methode, die subjektive Hotspot-Auswahl von Bereichen mit der höchsten Neovaskularisationsdichte. Hierbei werden nicht alle Mikrogefäße gezählt, sondern es wird mittels eines speziellen Mikroskopaufsatzes (sog. Chalkley-Punktraster), der ein Raster mit 25 zufällig verteilten Punkten enthält, bestimmt, welche Gefäße in die Zählung miteinbezogen werden sollen. Durch die Punkte verlaufen vertikale und horizontale Linien. Kollidiert ein Gefäß mit den vertikalen Linien wird es in die Zählung miteinbezogen. Alle gezählten Gefäße werden abschließend einheitslos als Chalkley-Zahl angegeben. Da bei dieser Methode der Beobachter weniger entscheiden muss, ob die gefärbten Mikrogefäße den Prinzipien der Neovaskularisation entsprechen, ist sie gegenüber der Weidner-Methode objektiver und zeitsparender. Allen Methoden gemeinsam ist die unausgereifte Standardisierung sowie fehlende Objektivität (bspw. subjektive Definition von Hotspots), Reproduzierbarkeit und Effizienz, da sie überwiegend sehr zeitaufwendig sind (Zhang, Wu, *et al.*, 2020).

Oftmals wird eine Kombination aus computergestützter Software und manueller Auswahl an ROIs verwendet, um die MVD zu ermitteln. Liang *et al.* (2021) identifizierten in ihrer Studie einzelne CD31- und CD34-positive Hotspots bei 100-facher Vergrößerung. Anschließend wählten sie bei 200-facher Vergrößerung fünf ROIs zufällig aus und ermittelten die MVD quantitativ mittels der Software Image-Pro plus 6.2.1. Die endgültige MVD wurde als Verhältnis der Summe der positiven Fläche zur Summe der Gesamtfläche ausgedrückt. Ebenfalls zur Quantifizierung der Vaskularisation, wenn auch bei etwas anderem Forschungshintergrund, wählten Nolff *et al.* (2018) in ihrer Studie über die *Histomorphometrische Beurteilung der MMP-9 und CD31 Expression während der Wundheilung unter Unterdrucktherapie beim Hund* bei 400-facher Vergrößerung zehn High-Power-Felder (HPF) nach dem Zufallsprinzip entlang der Wundoberfläche mit Bereichen der intensivsten Färbung als Hotspots aus und analysierten die digitalen Bilder mit einer automatisierten histomorphometrischen Software (positiver Pixelcount Makro der Aperio Image Scope Software der Firma Leica). Hierbei wurde der Index der Gefäßneubildung in Prozent ermittelt, indem die Anzahl positiv gefärbter Pixel pro HPF durch die Anzahl aller angefärbten Pixel pro HPF dividiert und mit 100 multipliziert wurde.

Um die Nachteile der Methoden zur MVD-Messung zu verbessern, werden wie auch in den beiden genannten Studien computergestützte Technologien eingesetzt, um die MVD zu ermitteln. Bislang existiert keine Software, die die MVD vollautomatisch analysieren und messen kann, da immer noch, insbesondere bei der Auswahl vaskulärer Hotspots, manuelle Eingriffe erforderlich sind. Marien *et al.* haben in den letzten Jahren ein halbautomatisiertes System entwickelt, das auf einer Kombination aus gleichmäßigen Zufallsstichproben sowie der manuellen Identifizierung von ROIs durch Pathologen basiert. Mit der stetigen Weiterentwicklung von Computeralgorithmen und künstlicher Intelligenz wird idealerweise zukünftig eine vollautomatische Analyse der Tumervaskularisation verfügbar sein (Zhang, Wu, *et al.*, 2020).

## **6. Massenspektrometrie**

### **6.1. Anwendungsgebiete**

Die Massenspektrometrie (MS) ist wegen ihrer hohen Sensitivität und niedrigen Nachweisgrenzen eine wichtige Analysetechnik zur Bestimmung von Elementkonzentrationen, Isotopen sowie der Struktur organischer und bioorganischer Verbindungen. Die Untersuchung und Analyse der Elementverteilungen (sog. Imaging oder Mapping) auf festen Probenoberflächen, bspw. Dünnschnitten von biologischen Geweben ist von zunehmendem Interesse in biowissenschaftlichen Studien, da dadurch Spurenelemente, Metalle, Halbmetalle oder Nicht-Metalle im Spuren- und Ultraspurenbereich detektiert werden können. Da diese Elemente an physiologischen Stoffwechselfvorgängen oder an der Pathogenese bedeutender Erkrankungen beteiligt sind, spielen sie in biologischen Systemen eine entscheidende Rolle. Bei der Laserablation-induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (LA-ICP-MS) und der matrixunterstützten Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) erfolgt die Probennahme von festen Oberflächen mittels eines fokussierten Laserstrahls, bei der Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) dagegen mit einem Primärionenstrahl (Becker *et al.*, 2010; Sussulini *et al.*, 2015). Es wurden bereits einige Studien veröffentlicht, die die LA-ICP-MS zur Untersuchung neurodegenerativer Erkrankungen (bspw. Parkinson oder Alzheimer) oder zum Nachweis von Kontrastmitteln auf Gadoliniumbasis und metallhaltiger Medikamente wie Cisplatin sowohl in humanen, als auch in tierischen Gewebeproben verwendeten, um die Elementverteilung in den entsprechenden Geweben genauer zu validieren (Sussulini *et al.*, 2015).

### **6.2. LA-ICP-MS**

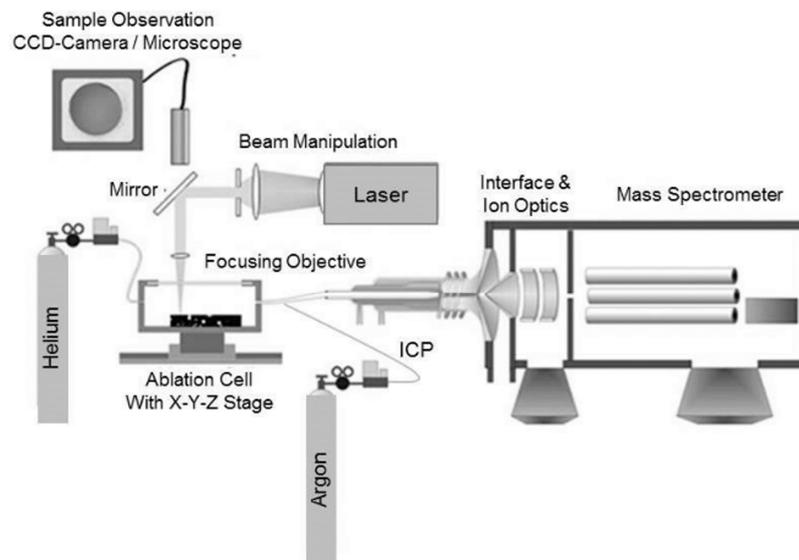
Die LA-ICP-MS hat sich aufgrund ihrer hohen Sensitivität als die Methode der Wahl zur Elementdarstellung in dünnen Gewebeschnitten entwickelt. Durch sie können inhomogene, orts aufgelöste Elementverteilungen in Gewebeschnitten oder Tumorregionen quantifiziert werden. Als vorteilhaft erweisen sich ihre hohe Genauigkeit, die Präzision der analytischen Daten und, dass dabei keine Aufladungs- und weniger Matrixeffekte auftreten, was die Quantifizierung der zu analysierenden Daten gegenüber anderen Methoden vereinfacht. Es gibt keine

zertifizierten Standardreferenzmaterialien für die Quantifizierungsverfahren, weshalb verschiedene Kalibrierungsstrategien existieren. Als Laser werden diverse handelsübliche Laserablationssysteme, die meist mit einem Nd:YAG-Laser ausgestattet sind, verwendet. Das Laserablationssystem ist häufig an ein Quadrupol-basiertes induktiv gekoppeltes Plasma-Massenspektrometer gekoppelt (Becker *et al.*, 2010).

Eine LA-ICP-MS-Messung kann in vier Schritte untergliedert werden:

1. Die Ablation und der Scan einer festen Probe mithilfe eines fokussierten Laserstrahls führen zur Erzeugung eines Aerosols aus Partikeln.
2. Das Aerosol wird über ein Transportgas, meist Helium (He) oder Argon (Ar), in das induktiv gekoppelte Plasma transportiert.
3. Die in den Partikeln enthaltenen Elemente werden ionisiert.
4. Die Ionen werden im Massenspektrometer nach ihren Masse-zu-Ladungsverhältnissen getrennt und detektiert (Becker, Matusch and Wu, 2014).

In Abbildung 17 ist der schematische Aufbau eines LA-ICP-MS-Systems nach Pfleging *et al.* dargestellt.



**Abbildung 17: Schematische Darstellung eines LA-ICP-MS-Systems (Pfleging *et al.*, 2015, S. 3)**

### 6.3. Elementimaging zur Untersuchung der Tumormikroumgebung

Tiermodelle finden häufig Einsatz, um Informationen neuartiger Arzneimittel bezüglich deren pharmakokinetischen Verhaltens, toxikologischen Profils und therapeutischer Wirksamkeit zu untersuchen. Von großem Interesse ist dabei die Arzneimittelakkumulation in Zielgeweben. Im Falle platinbasierter Chemotherapeutika kann dessen Akkumulation mit Hilfe der oben beschriebenen LA-ICP-MS erfolgen. Theiner *et al.* (2018) wiesen in ihrer Studie mit Hilfe der LA-ICP-MS eine heterogene Platinverteilung in den untersuchten Tumorproben nach, die auf mikroskopischer Ebene gut mit den histologischen Merkmalen des Tumors und des umgebenden Gewebes korrelierte. Sie beschrieben ebenfalls, dass in den meisten Fällen intratumoral eine niedrigere Konzentration an Platin als im angrenzenden Gewebe detektiert werden konnte, was darauf hindeuten kann, dass eine Bestimmung der durchschnittlichen Platinmengen in Tumorproben, wie bisher vielfach praktiziert, die Aufnahme des Medikaments im Tumorgewebe überbewerten könnte.

Ebenso stellten Pornwilard *et al.* (2013) das Potential der LA-ICP-MS von Kryoschnitten menschlicher Leberproben (gesund/ fibrotisch/ zirrhotisch) in ihrer Studie dar. Sie zeigten, dass die meisten Metalle eine gleichmäßige Verteilung im gesunden Lebergewebe aufwiesen, wohingegen in fibrotischen Lebern erhebliche Metallablagerungen nachzuweisen waren. Auch waren die Gesamtkonzentrationen von Eisen und Kupfer im pathologischen Lebergewebe 3-5-fach erhöht. Sie schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass die LA-ICP-MS ein sensitives Verfahren ist, das in der klinischen Praxis bei der Identifizierung und Einschätzung hepatischer Metallverteilungen hilfreich sein kann und auch geeignet erscheint, subtile Metallveränderungen während der Fibrogenese aufzudecken.

Die Massenspektrometrie wurde neben der Leber auch für verschiedene andere Gewebetypen, u.a. Bauchspeicheldrüsen-, Fett-, Gehirn-, Muskel-, Nieren- oder Tumorgewebe zur Messung der Kontrastmittelkonzentration eingesetzt. In einer Studie von Pugh *et al.* (2012) wurde die LA-ICP-MS eingesetzt, um die räumliche Verteilung von Gd-haltigen Kontrastmitteln und Pt-haltiger Chemotherapeutika in Ratten- und Schweinegehirnen zu untersuchen sowie Synergien mit der *in vivo*-MRT und den angefertigten histologischen Schnitten zu detektieren. Dabei erwies sich die LA-ICP-MS als leistungsstarke Ergänzung zum MRT, da sie neben der

höheren Empfindlichkeit, auch eine detaillierte räumliche Auflösung und Signalquantifizierung der Elementverteilungen ermöglichte. Auch lieferte die simultane Fe-Messung weitere nützliche Informationen über potenzielle Blutungsquellen und ermöglichte die Zuordnung anormaler Kontrastmittelverstärkungen im Rattenhirn.

Die aufgeführten Studien zeigen nur einen kleinen Ausschnitt der Anwendungsbereiche der LA-ICP-MS in biowissenschaftlichen Fachgebieten. In Bereichen der Leberkrebsforschung steckt diese vielversprechende Methode noch in den Kinderschuhen und bedarf des weiteren Einsatzes und damit der Etablierung sowie der Evaluation.

## **7. Tierversuche in der Forschung und deren Translation**

### **7.1. Tierversuchsmodelle in der HCC-Forschung**

In der biomedizinischen Forschung spielen Tierversuche seit jeher eine zentrale Rolle und das, obwohl ihr Nutzen zur Prädiktion menschlicher Erkrankungen und potenzieller Therapiemaßnahme umstritten ist. Auch die Verwendung experimenteller Tiermodelle zur Untersuchung von Lebertumoren, die dem Menschen ähneln, stellt die Forschung vor Herausforderungen, da das „ideale“ Tiermodell den natürlichen Verlauf, die Biochemie und Biopathologie des menschlichen HCCs nachbilden soll. Dabei ist zu bedenken, dass fast kein Modell spontan entsteht. Ein spontanes HCC-Modell würde aber am ehesten einen Überblick über das Zellwachstumsmuster, den Zellstoffwechsel und die Zelldifferenzierung erlauben. Nichtsdestotrotz konnten Tiermodelle in der Vergangenheit bereits wichtige Erkenntnisse über die Stadien der Hepatokarzinogenese und Tumormetastasierung sowie Validierung neuer Therapieansätze liefern. Am häufigsten wird die Maus (*Mus musculus*) in HCC-Tiermodellen verwendet, da sie auf histologischer und molekular Ebene Ähnlichkeiten mit menschlichen Leberläsionen aufweist. Es werden vorwiegend chemisch induzierte Modelle, Implantationsmodelle, virale und gentechnisch veränderte Modelle eingesetzt (Santos, Colaço and Oliveira, 2017).

Für die translationale Forschung bedarf es Modellen, die in der Lage sind, den menschlichen Zustand in seiner Komplexität entsprechend nachzubilden und Krankheiten anatomisch, genetisch, physiologisch und pathologisch zu reproduzieren sowie diese auf molekularer und zellulärer Ebenen nachzuahmen. Ebenso müssen die Modelle innerhalb eines praktikablen Zeitrahmens induzierbar sein und eine ausreichende Größe haben, um die in der klinischen Praxis eingesetzten Instrumente verwenden zu können. Daher werden im Rahmen der HCC-Forschung neben Kleintieren auch Großtiere verwendet. Das Tiermodell muss logistisch umsetzbar sein und Leiden und Schmerzen der Versuchstiere müssen auf ein unvermeidbares Minimum reduziert werden. Neben den am häufigsten verwendeten Nagetiermodellen (Mäuse und Ratten) werden darüber hinaus Kaninchen, Hunde, nichtmenschliche Primaten sowie Schweine verwendet (Obeid *et al.*, 2018). In Anbetracht der klinischen Bedeutung der TACE-Therapie beim HCC in fortgeschrittenem Stadium sollten Modellsysteme kombinatorische Behandlungen (bspw. TACE und zielgerichtete Therapien) nachbilden können, was im Mausmodell aufgrund der geringen Größe der Tiere nicht realisierbar ist. Daher werden Ratten-Modelle, wie das Diethylnitrosamin-induzierte Ratten-HCC-Modellsystem oder das multifokale orthotope Implantationsmodell verwendet. Im Gegensatz zum chemisch induzierten DENA-Modell, das häufig mit einer Leberfibrose und Zirrhose einhergeht, werden beim orthotopen Implantationsmodell Tumorzellen in die Pfortader injiziert und es entwickeln sich Tumore innerhalb einer gesunden Hintergrundleber (Groß *et al.*, 2015).

#### **7.1.1. Diethylnitrosamin-induziertes HCC-Modell der Ratte**

Im Jahr 1956 berichteten Magee *et al.* von der Leberkarzinogenese bei Albino-Ratten, die mit einer N-Nitrosamin-haltigen Diät gefüttert wurden. Von 20 Ratten entwickelten 19 Tiere primäre Lebertumore. Seitdem gewann diese Klasse chemischer Verbindungen besondere Aufmerksamkeit, insbesondere aufgrund ihrer Zielorganspezifität und der Tatsache, dass sie in fast allen getesteten Tiermodellen eine Karzinogenese hervorriefen (Magee and Barnes, 1956; Santos, Colaço and Oliveira, 2017).

Die orale oder parenterale Verabreichung kleinster Mengen von Diethylnitrosamin (DEN), das ebenso wie Dimethylnitrosamin (DMN) eine bekannte Nitrosaminverbindung darstellt, führt zu schweren Leberschäden. Aufgrund der Robustheit der

induzierten Leberveränderungen hat sich die Anwendung von DEN bei Nagetieren zu einem attraktiven Versuchsmodell entwickelt, das darauf abzielt, pathogenetische Veränderungen zu verstehen, die der Hepatokarzinogenese zugrunde liegen (Tolba *et al.*, 2015). Das DEN-induzierte HCC-Modell hat den Vorteil, dass es den Entwicklungszyklus der Hepatozytenschädigung, der Zirrhose und der Malignität, wie es beim menschlichen HCC beobachtet wird, rekonstruiert und dass es mit einer Leberinsuffizienz und Hypervaskularisation des Tumors einhergeht. Ein Nachteil besteht in der Nichtabdeckung von Tumoren, die sich ohne den Hintergrund einer Lebererkrankung entwickeln, wie es auch im humanen HCC vorkommt. Es wurden bereits erfolgreich Studien zur transarteriellen Chemoembolisation im Ratten-HCC-Modell durchgeführt, wobei festgehalten werden muss, dass die Interventionen mit langen Verfahrenszeiten verbunden waren, um eine selektive Angiographie zu erreichen (Obeid *et al.*, 2018).

## **7.2. Ethik von Tierversuchen und gesetzliche Grundlagen**

Die Anzahl der Versuchstiere entsprach im Jahr 2020 0,25 % aller verwendeten Tiere in Deutschland. Der mit Abstand größte Anteil der Tiere wurde für die Lebensmittelproduktion verwendet. Insbesondere aufgrund der Corona-Pandemie und der weitgreifenden Ausbrüche des neuartigen *severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2* (SARS-CoV-2-Virus) unter anderem auch in Großschlachtbetrieben, war im Jahr 2020 ein Rückgang der Schlachtzahlen zum Vorjahr zu verzeichnen. Im Gegensatz zum Jahr 2019 mit rund 763 Mio. wurden 2020 knapp vier Mio. Tiere weniger in der Lebensmittelindustrie verwendet (<https://albert-schweitzer-stiftung.de/aktuell/schlachtzahlen-2020>, abgerufen am 21.03.2022). Ebenso gingen pandemiebedingt die Versuchstierzahlen zurück. In Deutschland wurden 2020 rund 1,9 Millionen (Mio.) Wirbeltiere und Kopffüßer in Tierversuchen eingesetzt, was einen Rückgang um -14 % zum Vorjahr ergibt. Den mit Abstand größten Anteil nahmen dabei Mäuse mit knapp 70 % ein. Über die Hälfte aller Versuchstiere wurden in der Grundlagenforschung und knapp 12 % in der translationalen und angewandten Forschung verwendet ([https://www.bf3r.de/de/verwendung\\_von\\_versuchstieren\\_im\\_jahr\\_2020-288932.html](https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2020-288932.html), abgerufen am 20.03.2022).

Tendenziell wird immer häufiger die Notwendigkeit und die Frage des Nutzens von Tierversuchen diskutiert, obwohl zahlreiche etablierte Therapieformen (für u.a.

Infektionserkrankungen, Diabetes mellitus, diverse Krebserkrankungen) ohne Tierversuche nicht existieren würden (European Parliament, 2020).

Genzel *et al.* (2020) vertreten die Auffassung, dass zwar das Ziel die Forschung ohne Versuchstiere voranzutreiben lobenswert sei, aber deren Einsatz für Fortschritte in Human- und Veterinärmedizin zum jetzigen Zeitpunkt unverzichtbar ist. Insbesondere, da bei Multiorganerkrankungen, zu der sich auch COVID-19 entwickeln kann, derzeit verfügbare tierversuchsfreie Alternativen der Komplexität der Pathogenese nicht annähernd gerecht werden können. Vielmehr sollte man sich in Anbetracht der Zahl an Veröffentlichungen und Schnelligkeit der Wissenschaft ausführlicher damit auseinandersetzen, nur ausgewählte Modellsysteme zu verwenden, die basierend auf dem 3-R-Prinzip ethisch vertretbar sind. Hierfür haben in jüngster Vergangenheit Organisationen (u.a. die WHO) die sog. ARRIVE-Leitlinien entwickelt, mit dem Ziel durch eine detailliertere Berichterstattung von Tierversuchen eine effektivere und reproduzierbarere Forschungsarbeit zu erreichen (Brockhurst and Villano, 2021).

Die gesetzliche Grundlage des Tierschutzes in Deutschland ist in Artikel 20a des Grundgesetzes als Staatsziel verankert. Auf nationaler Ebene werden Versuchstiere darüber hinaus durch diverse Gesetze, unter anderem das Tierschutzgesetz (TierSchG), die Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV), die Versuchstiermeldeverordnung (VersTierMeldV) wie auch die Tierschutztransportverordnung (TierSchTrV) geschützt. Auf internationaler Ebene greift die sog. Versuchstierrichtlinie des europäischen Parlaments und Rates, *Richtlinie (RL) 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendete Tiere vom 22. September 2010*. Sie enthält auch das o.g. 3-R-Prinzip, das ein Konzept zur Verbesserung und Reduktion von Tierversuchen darstellt und nachfolgend genauer erläutert werden soll.

### **7.3. Das 3-R-Prinzip**

William Russell und Rex Burch veröffentlichten 1959 einen Leitfaden zur maximalen Reduktion von Tierleid. Seitdem hat sich das Konzept zum Grundsatz der 3-R-Prinzipien mit dem obersten Ziel, Tierversuche durch alternative Methoden zu ersetzen (Replacement), entwickelt. Sofern dies nicht möglich ist, müssen die für den Tierversuch verwendeten Tierzahlen auf ein Minimum reduziert werden (Reduction) und zusätzlich sind die angewandten Methoden und Haltungsbedingen

der verbleibenden Versuchstiere im Sinne des Tierwohls so zu optimieren, dass deren Belastung auf ein absolutes Minimum verringert wird (Refinement) (Russell and Burch, 1960). Es stehen eine Reihe von Maßnahmen, die eine verbesserte Haltung (sog. Environmental Enrichment) von Versuchstieren ermöglichen, zur Verfügung. Einfach umsetzbare Maßnahmen sind beispielsweise die Reduktion von Stress durch Verwendung von Plexiglasröhren zum Transport aus oder in den Käfig (= Tunnelhandling), der Einsatz von Analgetika bei Interventionen, die Verwendung der lateralen Beinvene statt der retroorbitalen Punktion zur Blutentnahme oder die Vermeidung von Eingriffen oder Euthanasien in unmittelbarer Nähe der Wurfgeschwister (Díaz *et al.*, 2020).

Im Jahr 2013 wurde das 3-R-Prinzip im Rahmen der TierSchVersV in deutsches Recht umgesetzt (Tierschutz-Versuchstierverordnung, 2013). Hierdurch müssen vor jedem Versuchsvorhaben der Schweregrad der Belastung der Versuchstiere eingestuft werden und Angaben über die Auswahl angemessener Narkosemittel und Analgetika zur Schmerzlinderung erfolgen (§ 31 Abs. 1 Nr. 2b u. 2c; TierSchVersV).

#### **7.4. Translationale Relevanz für die Veterinärmedizin und rechtliche Grundlagen**

Mit wachsendem Wohlstand der Menschen steigt auch die medizinische Versorgung der Haustiere. Dadurch gewinnen zunehmend differenzierte und aufwändige Behandlungsmethoden an Bedeutung. Eine Translation humanmedizinischer Forschungsergebnisse in die Tiermedizin – zumal die Erkenntnisse zunächst häufig an tierischen Organismen gewonnen werden – erweist sich deshalb als bereichernde Option. Dank des medizinischen Fortschritts können heutzutage in der modernen Kleintiermedizin inklusive ihrer Spezialgebiete (Onkologie, Kardiologie, Neurologie usw.) kardiovaskuläre Erkrankungen durch einen Herzklappenersatz oder Krebserkrankungen durch die frühzeitige Detektion mithilfe der Computertomographie mit Chemo- oder Strahlentherapie umfassend behandelt werden. Moderne Diagnostik und Therapien bedeuten für die Patientenversorgung viele Vorteile, sie müssen jedoch immer unter Berücksichtigung des finanziellen Hintergrunds des Patientenbesitzers abgewogen werden sowie allem voran ethisch vertretbar für die Patienten sein (Springer *et al.*, 2019). Neben den Standarddisziplinen der Kleintiermedizin steigt das

wissenschaftliche und klinische Interesse an interventionellen Diagnostik- und Therapieoptionen. Bereits gut etabliert sind kardiologische Interventionen wie Herzkathetheruntersuchungen inkl. Stentimplantationen, Verschluss eines persistierenden Ductus arteriosus botalli (PDA) oder Aorten- oder Pulmonalstenosen-Ballonierungen bei Hunden (Gordon and Miller, 2005; Scansen, 2018).

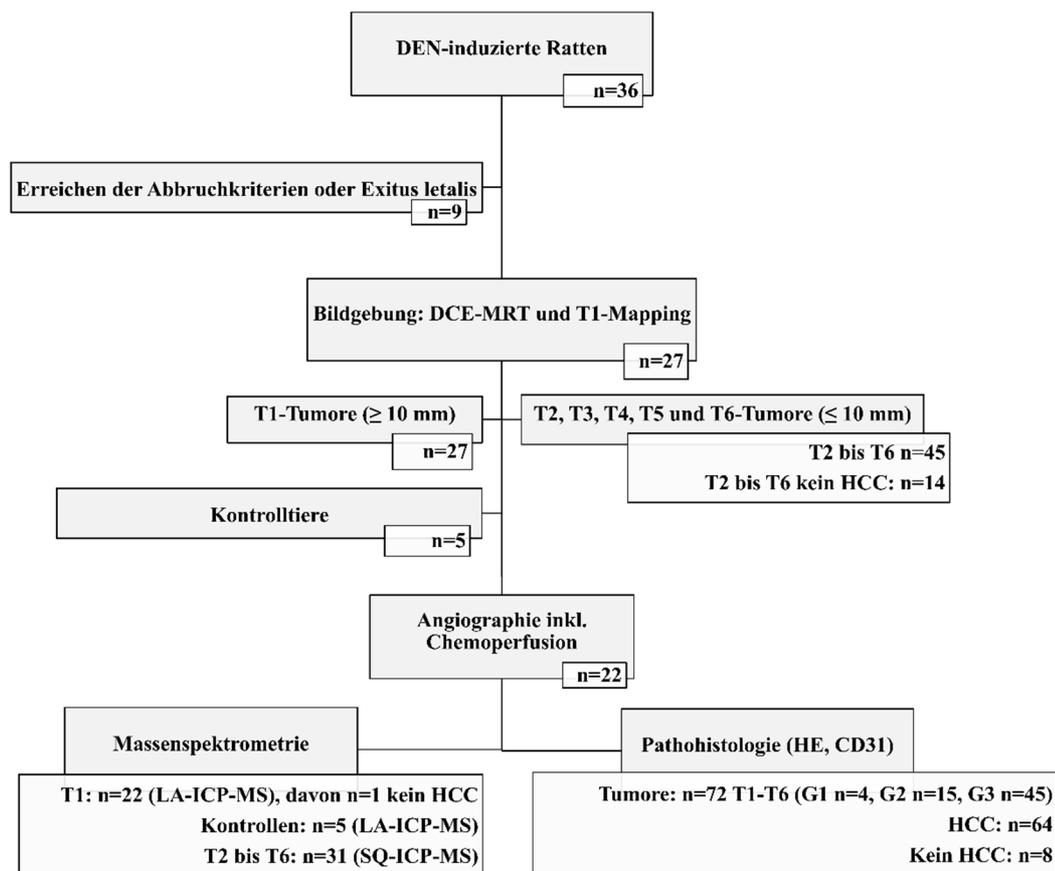
Darüber hinaus wurden bereits interventionelle Verfahren u.a. beim HCC oder Prostatakarzinom von Hunden angewendet, um die tumorversorgenden Hauptgefäße zu embolisieren (Oishi, Tani and Taura, 2018; Culp *et al.*, 2021; Rogatko *et al.*, 2021). Die Studie von Rogatko *et al.* (2021) kam zu dem Ergebnis, dass die TACE ein praktikables Verfahren beim inoperablem HCC darstelle und bei 85 % der Hunde die Erkrankung zeitweise stabilisierte oder ein partielles Ansprechen förderte. Auch bei Katzen wurde die TACE bereits erfolgreich angewandt. Im Vergleich zu Hunden sind jedoch aufgrund anatomischer Unterschiede, weitere alternative Ansätze erforderlich (Iwai *et al.*, 2015). Durch die fortschrittliche Bildgebung und deren weitreichender Anwendung wird eine zunehmende Anzahl von Zufallsbefunden fokaler Leberläsionen diagnostiziert, die es weiter aufzuarbeiten und gegebenenfalls zu therapieren gilt (Leela-Arporn *et al.*, 2019). Daher sollte Therapieoptionen wie der TACE auch in der Veterinärmedizin ausreichend Beachtung geschenkt werden, damit auch veterinärmedizinische Patienten von Therapieerfolgen aus der Humanmedizin profitieren können.

Bei der Translation von humanmedizinischen Therapieformen in die Veterinärmedizin müssen allerdings auch rechtliche Grundlagen berücksichtigt werden. Die Durchführung von Eingriffen und die Anwendung von Arzneimitteln darf bei Tieren nur in Anbetracht der Umsetzung der geltenden internationalen EU-Verordnung (EU) 2019/6 sowie unter Einhaltung der Umwidnungskaskade erfolgen. Durch die Verabschiedung des Tierarzneimittelgesetzes (TAMG) wurde die Verordnung in nationales Recht umgesetzt (European Parliament, 2019; TAMG, 2022).

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Versuchstiere

Die vorliegende Studie wurde innerhalb eines von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsantrags mit dem Aktenzeichen 55.2-2532-02-16-25 durchgeführt. Hierfür wurden 42 Wistar-Ratten mit albinotischem Phänotyp (RccHan:WIST) und einem Gewicht von 400 - 550 g im Tumormodell des Diethylnitrosamin-induzierten hepatozellulären Karzinoms der Ratte verwendet. Eine Kohorte mit sechs Tieren verstarb während der Induktionsphase, daher werden in der folgenden Übersicht (siehe Abbildung 18) lediglich 36 Versuchstiere aufgeführt. Vermutet wurde eine zuchtgenetische Komponente als Todesursache. Diese Kohorte wurde aus der Studie ausgeschlossen.



**Abbildung 18: Übersicht der Versuchstierzahlen sowie Tumorproben (T1-T6) zur massenspektrometrischen und pathohistologischen Evaluation**

Die Ratten stammten von dem kommerziellen Züchter Envigo (Re Schaijk, Niederlande). Es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, die zum Zeitpunkt des Studienbeginns ein Alter von acht Wochen hatten.

Die Kontrolltiere (n = 5) wurden dazu verwendet, den chirurgischen Zugang sowie die angiographische Intervention zu standardisieren. Entsprechend ihrer Größe erfolgte mittels MRT eine Einteilung der Tumore in T1 ( $\geq 10$  mm) sowie Resttumore T2-T6 ( $\leq 10$  mm). Für T1-Tumore erfolgte nach abgeschlossener digitaler Subtraktionsangiographie inklusive Chemoperfusion die orts aufgelöste LA-ICP-MS-Messung, für T2-T6-Tumore die nicht-orts aufgelöste Gesamtgehaltbestimmung mittels SQ-ICP-MS. Ein pathohistologisches Grading (G1-G3) sowie die Vaskularisationsquantifizierung mithilfe der immunhistochemischen CD31-Färbung wurde für alle T1- bis T6-Tumore durchgeführt.

## **2. Versuchstierhaltung**

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter Berücksichtigung der EU-Richtlinie 2010/63 im Versuchstierhaltungsraum der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Klinikums rechts der Isar, der unter der Leitung des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München betrieben wird.

Der Tierhaltungsraum unterliegt einer Zutrittsbeschränkung. In diesem herrscht ein strikter Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden mit voreingestellten Dämmerungsphasen und eine Luftfeuchtigkeit von 45 - 60 %. Die Raumtemperatur liegt konstant zwischen 20 - 22 °C. Die Tiere wurden täglich von ausgebildetem Tierpflegepersonal betreut und einmal wöchentlich, soweit es keinen Anlass für häufigere Untersuchungen und Gewichtskontrollen gab, von den versuchsdurchführenden Personen kontrolliert. Die Beurteilung erfolgte nach den im Tierversuchsantrag festgelegten Kriterien und mit Hilfe der durch die Regierung von Oberbayern genehmigten Score Sheets (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20). Beim Erreichen der Abbruchkriterien wurden die Tiere tierschutzkonform unter Isoflurannarkose mit einer Überdosis Pentobarbital (600 mg/kg i.p. Narcoren<sup>®</sup>, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) euthanasiert.

Die Ratten wurden in einzelbelüfteten Käfigen (Sealsafe Next Blueline IVC-Käfige Typ III H; Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland) in Zweiergruppen auf Holzgranulat als Einstreu gehalten (Select fine; Ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland), das zweimal wöchentlich gewechselt wurde. Im Sinne eines möglichst abwechslungsreichen Enrichments erhielten die Tiere autoklavierten Zellstoff und Sägespäne als Nistmaterial sowie ein Pappkartonhäuschen als Unterschlupf. Zu Fressen erhielten sie autoklaviertes Futter (Haltungsfutter No. 1324SP Ratte/Maus, 10 mm rund pelletiert, spezialbehandelt; Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) ad libitum. Zu Trinken wurde angesäuertes Trinkwasser (1N HCl, pH 3,5 - 3,0), das einmal wöchentlich, bei Bedarf auch häufiger gewechselt wurde, ebenfalls ad libitum angeboten. Nach Anlieferung der Tiere erfolgte eine einwöchige Eingewöhnungsphase, bevor mit der DENA-Induktion begonnen wurde.

Gewichtsentwicklung								
<b>Versuchsleiter</b>								
<b>Stellvertreter</b>								
<b>Tierschutzbeauftragter</b>								
<b>TVA Nummer</b>								
<b>Herkunft der Tiere</b>		Envigo						
<b>Spezies</b>		Wistar-Ratte						
<b>Geschlecht</b>		männlich						
<b>Alter bei Ankunft</b>		8 Wochen						
<b>Haltungsraum</b>		KAR						
	<b>Datum</b>							
	<b>Woche</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
	<b>Tag</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>28</b>	<b>35</b>	<b>42</b>
<b>Standardgewicht</b>								
<b>Tiernummer</b>								

Abbildung 19: Aufzeichnungsbogen zur Gewichtsentwicklung der Tiere

		Scoring														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="text-align: center;">Versuchsleiter</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Stellvertreter</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Tierschutzbeauftragter</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">TVA Nummer</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Scoringdatum</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Tag der Studie</td></tr> <tr><td style="text-align: center;">Zeitpunkt</td></tr> </table>	Versuchsleiter	Stellvertreter	Tierschutzbeauftragter	TVA Nummer	Scoringdatum	Tag der Studie	Zeitpunkt	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td colspan="2" style="text-align: center;">Verantwortlich für das Scoring</td></tr> <tr><td style="width: 50%;">Name</td><td style="width: 50%;"></td></tr> <tr><td>Name</td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> </table>	Verantwortlich für das Scoring		Name		Name			
Versuchsleiter																
Stellvertreter																
Tierschutzbeauftragter																
TVA Nummer																
Scoringdatum																
Tag der Studie																
Zeitpunkt																
Verantwortlich für das Scoring																
Name																
Name																
<b>Scoringtabelle</b>		Tiernummer														
<b>Beobachtung</b>	<b>Punkte</b>															
<b>I Veränderungen im Körpergewicht</b>																
Keine oder Zunahme	0															
< 5% Verlust	1															
5 - 10% Verlust	5															
11 - 20% Verlust	10															
> 20% Verlust	20															
(zum Ausgangsgewicht)																
<b>II Allgemeine Veränderungen</b>																
Normales Fell, Normale Körperöffnungen	0															
Verminderte Selbstpflege	1															
	5															
Verschmutztes Fell oder Körperöffnungen, Erhöhter Tonus																
Verschmutzte Haut, verklebte Körperöffnungen, abnorme Haltung, hoher Muskeltonus	10															
Krämpfe, Lähmungserscheinungen, Körpertemperaturabfall	20															
Zwischenscore																
Score von letzter Inspektion																
<b>III Verhalten</b>																
Normal	0															
Geringe Veränderungen	1															
Abnormes Verhalten*	5															
Hyperkinese bei sonst typischem Verhalten, palpabler Tumor >1,5 cm	10															
Autoaggression, Hyperkinese bei abnormem Verhalten*, Sichtbarer Tumor oder palpabler Tumor > 3cm	20															
<b>IV OP-Wunde</b>																
Reizlos, Sauber	0															
Nahtdehiszenz, Wundinfektion, Kratzen	10															
Eröffnung des OP-Situs	20															
Gesamtscore																
<b>Evaluation</b>		<b>Punkte, Vorgehen</b>														
Belastungsniveau	0 =	0	Keine Belastung													
Belastungsniveau	1 =	1 - 9	Geringe Belastung, tägliche Kontrollen													
Belastungsniveau	2 =	10 - 19	Mittlere Belastung, Tierschutzbeauftragten informieren, ggf. Schmerzmedikation													
Belastungsniveau	3 =	20 - >20	Hohe Belastung: Direkte Euthanasie, "humane endpoint"													
* abnormes Verhalten: Desinteresse, Apathie, Ängstlichkeit																
** nach 3 Tagen Euthanasie, wenn keine Besserung erfolgt																

**Abbildung 20: Score Sheet zur Überwachung des Gesundheitszustandes der Tiere**

### 3. Versuchsaufbau

Der Versuch gliederte sich entsprechend der unter I. erläuterten Abbildung 1. In der Induktionsphase wurde den Versuchstieren Diethylnitrosamin (DENA) über das Trinkwasser für einen Zeitraum von 8 Wochen ad libitum verabreicht. Es schloss sich eine zweiwöchige Auswaschphase an, um das DENA vor dem Start des MRT-Screenings restlos aus dem Körper auszuschleiden. In den folgenden Wochen wurde mit den wöchentlichen Tumorscreenings begonnen. Hierfür wurden die Ratten einmal wöchentlich im 7T-Kleintiermagnetresonanztomographen gemessen.

Bei einer Tumorgröße von  $\geq 10$  mm wurde am nächsten Tag eine dynamische kontrastmittelverstärkte MRT durchgeführt (DCE-MRT), um die Auswaschphase genauer charakterisieren zu können. Am nächsten Tag fand die angiographische Bildgebung in Form einer digitalen Subtraktionsangiographie statt. Hierbei wurde den Versuchstieren ein transkarotidaler Mikrokatheter bis in die A. hepatica communis eingebracht und unter Kontrastmittelgabe eine Durchleuchtungsserie angefertigt. Im Anschluss erfolgte die gleichzeitige Injektion des Kontrastmittels Primovist® (0,2 ml/kg, 1:10 mit NaCl verdünnt) über die laterale Schwanzvene sowie des Chemotherapeutikums Cisplatin (2,5 mg/kg) über den Mikrokatheter direkt. Nach einer vorher definierten Zeitspanne wurden die Tumore (T1-T6) über eine mediane Laparotomie lokalisiert und entnommen.

Für die histopathologische Untersuchung wurde eine Hälfte der Tumore in 4 % PFA, die andere Hälfte für die massenspektrometrische Untersuchung in flüssigem Stickstoff gelagert. Zuletzt erfolgte das Tumorgrading mit angefertigten HE-Färbungen und die Auswertung der Tumolvaskularisation über die Immunhistochemie mittels CD31-Färbung. Ebenso wie die orts aufgelöste LA-ICP-MS-Messung der Substanzanreicherungen von Gadolinium (Gd) und Platin (Pt) wurden Eisen (Fe), Kupfer (Cu), Zink (Zn) und Phosphor (P) mittels LA-ICP-MS für T1-Tumore evaluiert sowie die Korrelation mit den Bildgebungsdaten aus MRT und Angiographie erstellt. Für T2-T6-Tumore erfolgte aufgrund der deutlich kürzeren Messzeiten nur die nicht-orts aufgelöste SQ-ICP-MS-Messung.

## **4. DENA-Induktion**

Die DENA-Induktion erfolgte im Halteraum der Tiere. Hierfür wurde den acht Wochen alten Ratten über einen Zeitraum von acht Wochen DENA (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) als 0,01%ige Lösung über das Trinkwasser ad libitum verabreicht. Diese Trinkwasserlösung wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Um das DENA wieder restlos aus dem Körper ausscheiden zu können, erfolgte im direkten Anschluss an die Induktion eine zweiwöchige Auswaschphase, in der die Ratten wieder angesäuertes Trinkwasser ad libitum erhielten.

## **5. MR-Bildgebung**

### **5.1. Vorbereitung der Tiere für die Bildgebungen**

Sowohl für die Durchführung des wöchentlichen Tumorscreenings als auch die DCE-Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie wurden die Ratten mit Isofluran anästhesiert.

Die Einleitung erfolgte in einer Ganzkörperkammer (Induction chamber rats, Rothacher Medical GmbH, Heitenried, Schweiz) mit 5 % Isofluran und einem Sauerstoffdurchfluss von 2 L/min bis zum Verlust des Stellreflexes. Im Zuge der Verbringung von Ganzkörper- zu Kopfkammer wurden die Ratten gewogen und Augensalbe (Bepanthen® Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) auf die Cornea als Austrocknungsschutz aufgetragen. Daraufhin wurden die Ratten zum Screening in den 7T-Kleintier-Magnetresonanztomographen verbracht. Die Erhaltung der Inhalationsnarkose während der Messungen erfolgte bei 1,5 - 2,5%iger Isoflurankonzentration und 2 L/min Sauerstoffdurchfluss mittels einer Kopfkammer, die je nach Bedarf reguliert werden konnte.

Hatten ein oder mehrere Tumore einen Durchmesser  $\geq 10$  mm erreicht, folgte am nächsten Tag eine dynamisch- kontrastmittelverstärkte Sequenz (DCE). Hierfür wurden die Ratten, ebenso wie für das Tumorscreening, zunächst mittels Ganzkörperkammer bis zum Stellreflexverlust narkotisiert. Nach erneutem Erfassen des Körpergewichts, Einbringen von Augensalbe und Lagerung auf einer Wärmematte (16-Watt-Wärmematte; TRIXIE Heimtierbedarf GmbH & Co. KG,

Trap, Deutschland) wurde die Narkose über eine Kopfkammer gesteuert bis ein Venenkatheters (BD Neoflon™ i.v. Venenverweilkanüle, Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, USA) in die laterale Schwanzvene zur Kontrastmittelapplikation gelegt wurde. Über eine angeschlossene Verlängerung (Perfusionsleitung PE 150 cm für Nimotop® S pro infusione, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) wurde während der DCE-Messung das im Verhältnis 1:10 mit isotonischer Kochsalzlösung (Isotonischer 0,9%iger-NaCl-Lösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verdünnte leberspezifische Kontrastmittel Dinatrium-gadoxetat (Primovist® 0,25 mmol/ml Injektionslösung, Fertigspritze, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) pumpengesteuert (Harvard Apparatus Pump 11 Elite, Holliston, Massachusetts U.S.A.) injiziert.

Nach Legen des Venenverweilkatheters wurde die Injektionsnarkose nach standardisiertem MMF-Protokoll i.m. in die lange Oberschenkelmuskulatur injiziert. Um einen fließenden Übergang von Inhalations- zu Injektionsnarkose zu gewährleisten, wurde die Inhalationsnarkose für weitere 1 - 2 Minuten aufrechterhalten. Ca. 10 Minuten nach MMF-Injektion wurden die Ratten in das 7T-Kleintier-MRT umgelagert. Um ein Auskühlen zu verhindern, wurde die Körpertemperatur der Tiere dort mit warmer Luft (Mistral-Air® Plus, The37°Company, Amersfoort, Niederlande) konstant im physiologischen Bereich (37,5 – 38,5 °C) gehalten.

## **5.2. Überwachung der Vitalparameter während der Bildgebung**

Die Atmung und innere Körpertemperatur (IKT) der Tiere wurden während der gesamten Messung mit einem abdominal platzierten, drucksensitiven Atemkissen und einer Rektalsonde kontrolliert (SA Instruments Inc., New York, USA).

Aufgrund des sehr starken 7T Magnetfeldes dürfen im MRT-Raum nur dafür zugelassene Spezialüberwachungsgeräte verwendet werden, weshalb auf eine zusätzliche Vitalfunktionskontrolle mittels bspw. Pulsoxymetrie, Elektrokardiogramm (EKG) oder Kapnographie verzichtet wurde und die Spontanatmung als Überwachung einer angemessenen Narkosetiefe als ausreichend erachtet wurde. Es traten keine Narkosezwischenfälle auf.

### 5.3. Tumorscreening

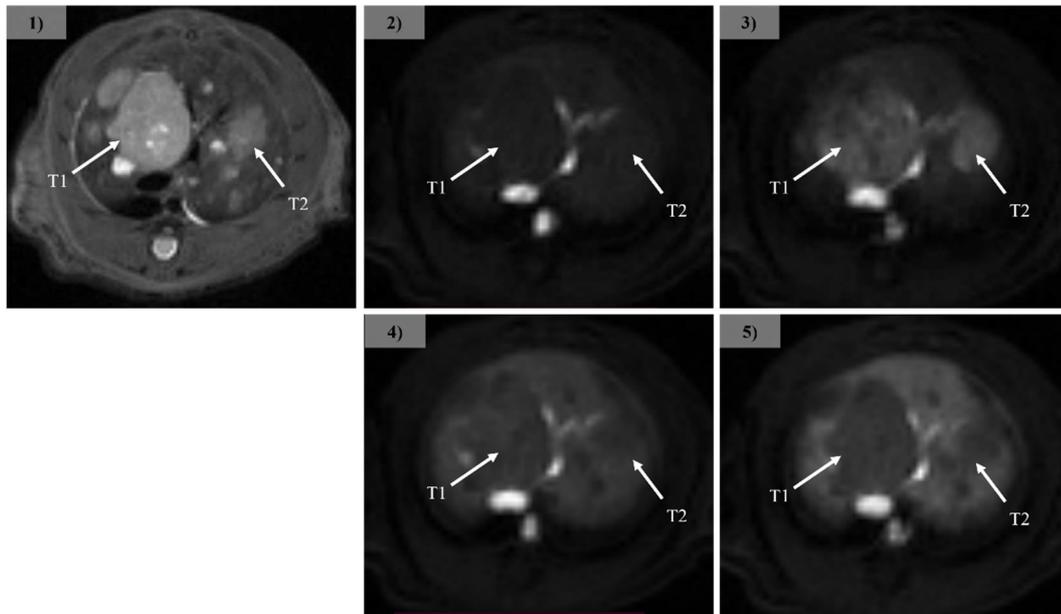
Zum Screening der Tumorknoten wurde wöchentlich eine T2-gewichtete MRT-Messung unter Verwendung eines 7T-Kleintier-MRTs (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) mit Bruker AVANCE III HD Elektronik (Bruker Corporation, Billerica, USA) unter Verwendung einer Volumenspule (RAPID Biomedical GmbH, Würzburg-Rimpar, Deutschland) durchgeführt, bis einer oder mehrere Tumore einen Durchmesser von  $\geq 10$  mm erreichten.

Um die Tumore zu lokalisieren, wurden axiale Bilder mit einer anatomischen, T2-gewichteten Sequenz mit folgenden Einstellungen akquiriert: Field of view 68 x 68 mm; Repetitionszeit (TR) 3000 ms; Echozeit (TE) 30 ms; Schichtdicke 2 mm; data matrix 136 x 136; Schichtanzahl 21, averages 8, Flip angle 90 °. Hatte mindestens ein Tumor einen Durchmesser von  $\geq 10$  mm, wurde zum Nachweis der Auswaschphase, die charakteristisch für das HCC ist, am darauffolgenden Tag die DCE-Bildgebung durchgeführt.

### 5.4. T1- Mapping und DCE-Bildgebung

Die Etablierung und Auswertung der magnetresonanztomographischen Daten ist Teil einer anderen Arbeit und soll hier nur der Vollständigkeit halber kurz aufgeführt werden: Zur Grenzenbestimmung der Tumore erfolgte zunächst, wie bereits beim Tumorscreening beschrieben, eine T2-gewichtete Sequenz. Daraufhin konnte die T1-gewichtete Sequenz mit nachfolgender DCE, während der das Kontrastmittel appliziert wurde, sowie die sich daran unverzüglich anschließenden T1- Serien bis 30 min nach Kontrastmittelapplikation akquiriert werden.  $25 \pm 0,9$  s nach Start der DCE-Sequenz wurden 0,2 ml/kg des leberspezifischen Kontrastmittels Primovist® i.v. über eine Spritzenpumpe in einer 1:10 Verdünnung (siehe Punkt 5.1) in die laterale Schwanzvene appliziert. Die Flussrate betrug 150  $\mu$ l/s. Die T1 gewichteten Serien dienten der Untersuchung des Tumorverhaltens nach Kontrastmittelgabe und zur Messung der Tumorperfusion (siehe Abbildung 21). Die DCE-Sequenz wurde mit folgenden Einstellungen akquiriert: 2D FLASH, Schichtdicke 3 mm, TR 3.33, TE 1.45, averages 5, Flip angle 20°, Image size 72x72, FOV 54x54, Temporal resolution 1 sec, images 240.

Die Datenakquirierung beim T1-Mapping wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt: 2D inversion recovery, slice thickness 3mm, TR -, TE 4 ms, TI 10 ms, averages 1-6, Flip angle 90°, Image size 54x54, FOV 54x54.



**Abbildung 21: Screening und DCE-Bildgebung eines Versuchstieres mit markierten Tumoren T1 und T2: (1) Screening (Serie 2, Image 18, hyperintens zum Leberhintergrund), (2) DCE-Bildgebung (Serie 4, Image 13, isointens zum Leberhintergrund) mit (3) Hyperenhancement (Serie 4, Image 38, hyperintens zum Leberhintergrund) und (4) Wash-out (Serie 4, Image 70, isointens zum Leberhintergrund) sowie (5) Kontrastmittelumkehr (Serie 4, Image 148, hypointens zum Leberhintergrund)**

## 5.5. Antagonisierung der Injektionsnarkose

Im Anschluss an die DCE-Messung erfolgte die Antagonisierung der Injektionsnarkose mit dem Alpha-2-Rezeptorantagonisten Atipamezol (Antisedan®, Pfizer, Karlsruhe 0,75 mg/kg) und dem Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil (Anexate®, Pfizer, Karlsruhe 0,2 mg/kg) subkutan.

## 6. Angiographie

### 6.1. Anästhesie

Die Anästhesie der Ratten erfolgte nach standardisiertem Injektionsnarkoseprotokoll nach Körpergewicht mit einer vollständig antagonisierbaren Anästhesie (VAA). Es wurde eine Kombination aus einem Alpha-2-Agonisten (Medetomidin, Domitor®, Pfizer, Karlsruhe 1,5 mg/kg), einem Benzodiazepin (Midazolam, Dormicur®,

Hoffman-La Roche, Wyhlen 2 mg/kg) und einem Opioid (Fentanyl, FentanylJanssen®, JanssenCilag GmbH, Neuss 0,005 mg/kg) verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 0,25 ml pro Injektionsstelle intramuskulär appliziert wurde. Zum Schutz der Cornea wurde Augensalbe (Bepanthen® Bayer Vital GmbH, Leverkusen) eingebracht.

## **6.2. OP-Vorbereitung**

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe im Hypnosestadium (III<sub>1</sub>) ca. 10 min nach Injektion, wurde ein Venenkatheter (BD Neoflon™ i.v. Venenverweilkanüle, Becton Dickinson Company, Franklin Lakes, USA) in die lateralen Schwanzvene eingeführt und mit Klebeband (Durapore; 3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) fixiert. Der Halsbereich der Ratten wurde ausgiebig ausgeschoren (kabellose Kleintier-Schermaschine Aesculap® Exacta, Braun, Buchbach) und desinfiziert. Zur Konstanthaltung der Körpertemperatur wurden die Ratten auf einer Wärmematte (16-Watt-Wärmematte; TRIXIE Heimtierbedarf GmbH & Co. KG, Trap, Deutschland) platziert. Eine Temperaturkontrolle erfolgte mit Hilfe eines rektal eingeführten flexiblen Thermometers (Modell SC 41 flex, K-jump Health Co, New Taipei City, Taiwan) in regelmäßigen Abständen.

## **6.3. Schmerzmanagement**

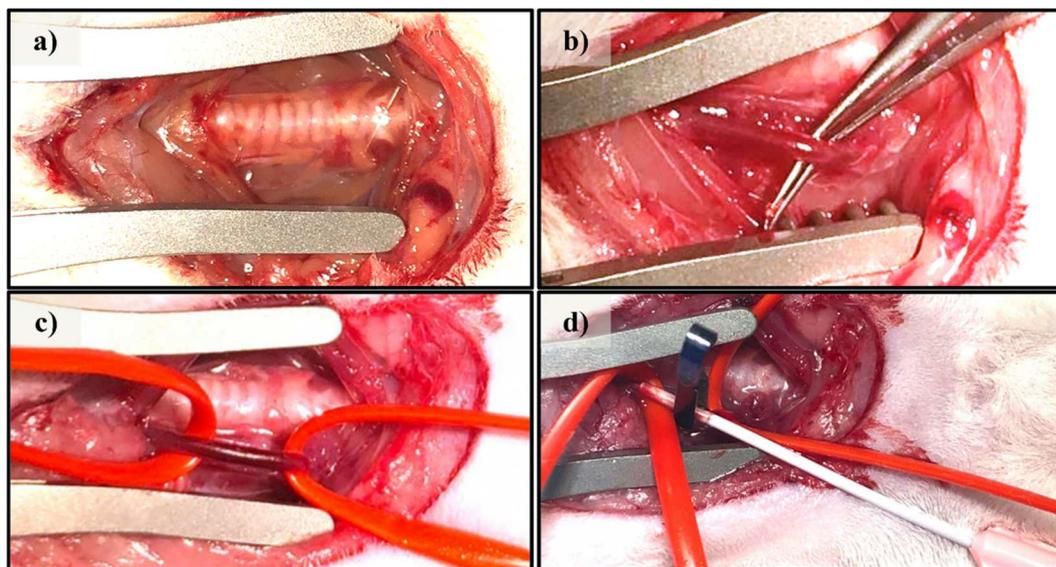
Die Ratten erhielten 30 min präoperativ Carprofen (4 mg/kg s.c. Rimadyl®, Pfizer GmbH, Berlin). Bereits mit der Einleitung wurde das Opioid-Analgetikum Fentanyl (0,005 mg/kg i.m.) als Bestandteil der Injektionsnarkose verabreicht. Basierend auf der Überprüfung der Narkosetiefe (z.B. Reflexkontrollen, Atmung, Bulbusstellung) wurde intraoperativ die halbe Menge MMF nachdosiert, wodurch zusätzlich zur Anästhesie auch weiterhin eine Analgesie gewährleistet wurde.

## **6.4. Durchführung**

Die Ratten wurden in Rückenlage auf einer Wärmematte positioniert. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums (III<sub>2</sub>) erfolgte ein Hautschnitt von ca. 20 - 25 mm Länge mit einer kranialen Begrenzung einige Millimeter hinter dem Zungenbein und kaudal kurz vor das Manubrium sterni reichend. Nach Eröffnung der Haut und Freilegung des M. sternohyoideus unter Lateralverlagerung der Glandulae mandibulares und parotidei sowie Fettgewebes, wurden beide Muskelbäuche des M. sternohyoideus stumpf voneinander getrennt, woraufhin die

direkte Sicht auf die Trachea ermöglicht wurde.

Links der Trachea (siehe Abbildung 22 a) wurde nun vorsichtig in die Tiefe präpariert und die Vagina carotica mit enthaltener A. carotis communis sinistra (LCCA), dem N. vagus und der V. jugularis interna freigelegt. Unter Schonung des N. vagus wurde die LCCA aus der gemeinsamen Bindegewebs Scheide gelöst (siehe Abbildung 22 b) und mit Hilfe zweier Haltezügel fixiert und für die folgende Punktion in Lage gebracht (siehe Abbildung 22 c). Die Punktion erfolgte mit einer 20G-Kanüle (Röntgenfähiger Katheter 20G, Abbocath-T, Amsino Medical, Shanghai, China) unter Spannung der beiden Haltezügel. Sobald der Mandrin korrekt intraarteriell saß, wurde die Kanüle entfernt und der Plastikvenenkatheter so weit wie möglich in das Gefäß vorgeschoben, wo er anschließend von außen mit einer Mikroklammer fixiert wurde (siehe Abbildung 22 d).



**Abbildung 22: Chirurgischer Zugang zur Darstellung und Punktion der A. carotis communis sinistra sowie Vorschieben und Fixation des Plastikvenenkatheters intraarteriell (rechtsseitig cranial, linksseitig caudal)**

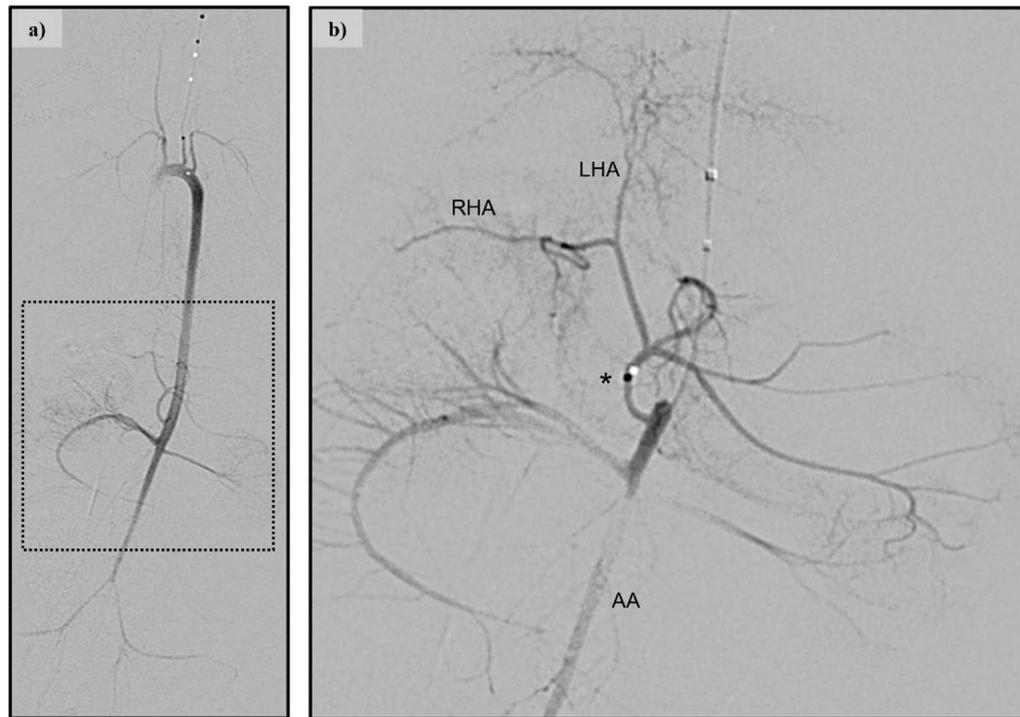
Nun konnte der kraniale Haltezügel in dem Maße gelockert werden, sodass der Katheterführungsdraht vorgeschoben werden konnte. Nach angiographischer Lagekontrolle wurde im Anschluss ein Y-Konnektor (9,5 F Lumen, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) als Verbindungsstück angebracht und der Angiographiekatheter (SONIC 1.2F-Mikrokatheter mit 0,007 Hybrid-

Führungsdraht, Balt Extrusion, Montmorency, Frankreich) mittels Einführhilfe in das Gefäß eingebracht. Unter angiographischer Bildgebung (Allura Centron, Philips Medizin Systeme, Hamburg, Deutschland) wurde die Aorta abdominalis bis in die A. hepatica communis katheterisiert und eine Durchleuchtungsserie unter Kontrastmittelgabe (Imeron® 300 M, 300 mg Iod/ml, Injektionslösung Iomeprol, Bracco Imaging Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland) zur Darstellung des Gefäßsystems und der Tumorknoten angefertigt. Die Durchleuchtungsserie wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt (siehe Tabelle 3):

**Tabelle 3: Einstellung der Angiographiebildgebung**

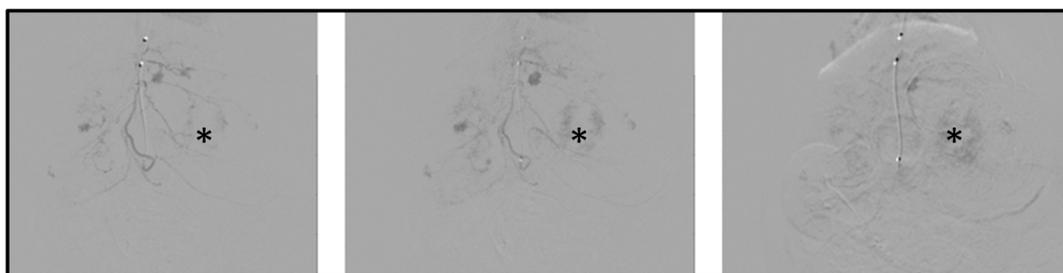
<b>Hauptanwendung:</b>	vaskulär
<b>Anwendung:</b>	Abdomen
<b>Verfahren:</b>	Abdomen schnell 6 B/s
<b>Patiententyp:</b>	Kind (15 - 40 kg)

Es erfolgte die selektive, wenn möglich auch die superselektive Katheterisierung der A. hepatica und ihrer Aufzweigungen (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** a) Übersicht der Aorta abdominalis mit Aortenbogen und b) vergrößerter Ausschnitt der Katheterisierung eines Versuchstieres mit Darstellung der Aorta abdominalis (AA) sowie der Katheterspitze (\*) im Truncus coeliacus inklusive der Aufzweigung der A. hepatica communis in die A. hepatica dextra (RHA) und A. hepatica sinistra (LHA)

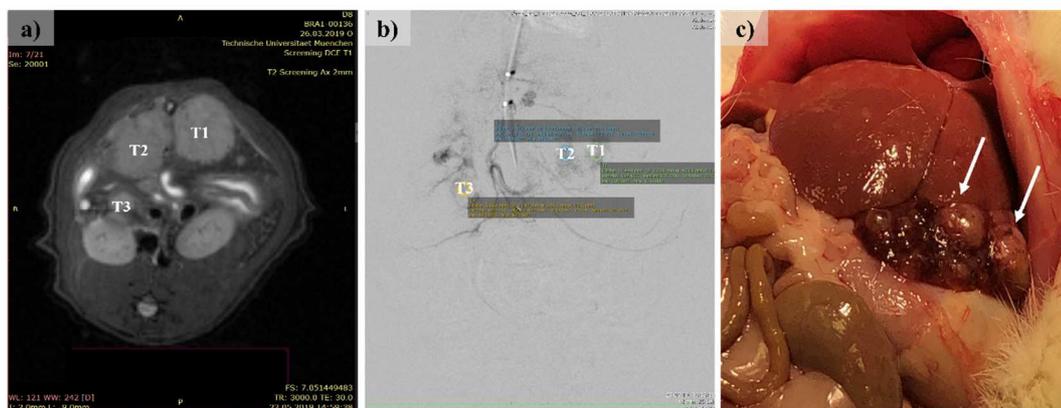
Für die Durchleuchtungsserie wurden 150  $\mu$ l Kontrastmittel mit einer Flussrate von 150  $\mu$ l/s unter Verwendung derselben Spritzenpumpe, die für die DCE-MRT Bildgebung verwendet wurde, injiziert (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Beispiel von Standbildern einer akquirierten Durchleuchtungsserie und Anflutung des Kontrastmittels im Tumorknoten (siehe \*)

Nach erfolgreichen Durchleuchtungsserien wurde der Katheter mit isotoner Kochsalzlösung gespült, das Chemotherapeutikum Cisplatin (Cisplatin Teva® 1 mg/ml, TEVA Generics GmbH, Ulm, Deutschland) 2,5 mg/kg injiziert und erneut mit isotoner Kochsalzlösung nachgespült. Zeitgleich wurden 0,2 ml/kg Primovist®, das zuvor 1:10 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt wurde, über den Schwanzvenenkatheter injiziert. Es wurde hierbei immer darauf geachtet insgesamt die von der GV SOLAS empfohlene maximale Dosis von 5 ml/kg KGW für die i.v. Bolusapplikation nicht zu überschreiten.

Nach einer definierten Zeitspanne von 10 bis 60 Minuten (10, 15, 20, 30, 60) erfolgte die Euthanasie der Ratten in tiefer Allgemeinanästhesie durch Entbluten mittels kardialer Punktion mit einer 20G-Kanüle. Hierbei wurden ca. 50 % der Gesamtblutmenge entnommen. Nach Eintritt des Todes erfolgte die Tumorentnahme über eine mediane Laparotomie. Die zuvor anhand der MRT-Bilder festgelegten Nomenklaturen als Tumor 1 (=T1), Tumor 2 (=T2) usw. wurden den vorgefundenen Tumoren *in situ* zugeordnet (siehe Abbildung 25).



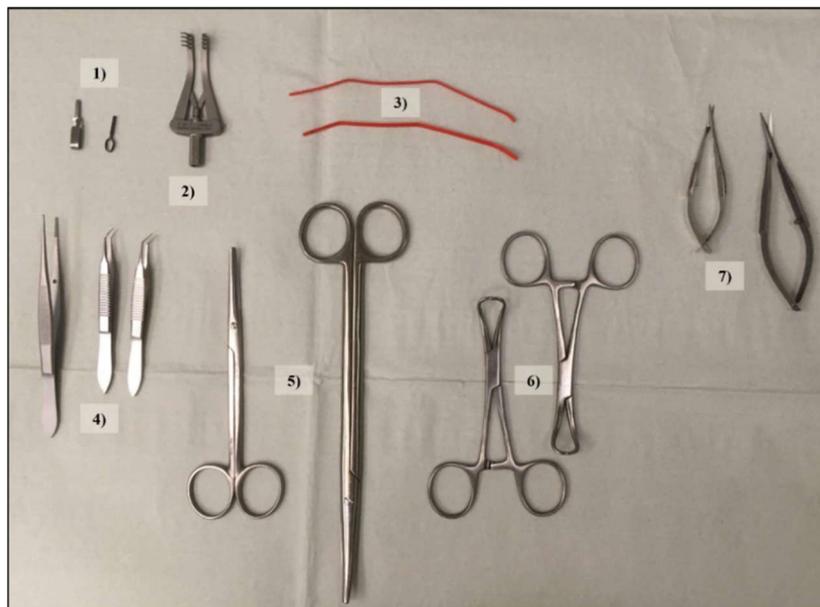
**Abbildung 25: a) Screening (Serie 2, Image 7, Tumore (T1-T3) hyperintens zum Leberhintergrund) und b) DSA-Standbild mit markierten Tumoren (T1-T3) sowie c) Tumore in situ (Pfeile)**

Folgende Instrumente (siehe Abbildung 26) wurden für die angiographische Intervention verwendet:

1. Mikroklemmen
2. Spreizer
3. Haltezügel
4. Anatomische Pinzette und Mikro-Pinzetten
5. Chirurgische Scheren
6. Klemmen nach Backhaus
7. Mikro-Scheren

Nicht in Abbildung 26 dargestellt:

8. Mikrokatheter und Hybrid-Führungsdraht
9. Y-Konnektor
10. Skalpell



**Abbildung 26: Verwendete Instrumente: (1) Mikroklemmen, (2) Spreizer, (3) Haltezügel, (4) Anatomische Pinzette und Mikro-Pinzetten, (5) Chirurgische Scheren, (6) Klemmen nach Backhaus und (7) Mikro-Scheren**

## 7. Gewebeaufarbeitung

### 7.1. Tumorentnahme, Lagerung und Versand

Die Tumorentnahme erfolgte unmittelbar nach der Euthanasie, wobei die Tumore der Leber *in situ* einzeln entnommen wurden.

Die Tumore wurden mittig in zwei gleich große Proben geteilt. Eine Hälfte wurde für die pathohistologische Untersuchung mindestens 24 Stunden in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) fixiert und anschließend in hauseigen hergestellte, phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (PAN Biotech, GmbH, Aidenbach, Deutschland) überführt. Die zweite Tumorthälfte wurde für die Massenspektrometrie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Des Weiteren wurden Gewebeproben der Restleber, der Nieren, der Milz, des Herzens, der Lunge sowie der Vorderarmmuskulatur entnommen und ebenso in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Versand zur massenspektrometrischen Untersuchung bei -80 °C gelagert. Der Versand der Proben für die massenspektrometrische Untersuchung am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Westfälische Wilhelms-Universität (WWU) Münster erfolgte zur Gewährleistung der Kühlkette trockenisgekühlt.

## 8. Pathohistologie

Die Bearbeitung der pathohistologischen Teilproben erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung für vergleichende experimentelle Pathologie des Instituts für Pathologie der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München. Hierbei wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Schnitte angefertigt:

**Tabelle 4: Übersicht der angefertigten Schnitte**

Leerschnitt	Schnittdicke [ $\mu\text{m}$ ]	Färbung
Tumor	1 - 2	HE
Tumor	1 - 2	IHC CD31

### **8.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Gewebe wurden mindestens 48 Stunden in 10 % neutral gepufferter Formalinlösung fixiert, unter Standardbedingungen (Leica ASP300S, Wetzlar, Deutschland) dehydratisiert und in Paraffin eingebettet. Serielle 2 µm-dünne Schnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom (HM355S, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) angefertigt. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde an entparaffinierten Schnitten mit Eosin und Mayers Haemalaun gemäß einem Standardprotokoll (siehe Abbildung 27) manuell durchgeführt.



## 1. Färbung

Entparaffinierung der Schnitte und die Färbung erfolgen von Hand:

### 1.1 Arbeitsschritte im Färbeautomaten

Färbeschritt Nr.	Bad	Zeit min	Bemerkungen
1.	Xylol	5	
2.	Xylol	5	
3.	Isopropanol	5	
4.	Isopropanol	5	
5.	Alkohol 96%	2	
6.	Alkohol 96%	2	
7.	Alkohol 70%	2	
8.	Alkohol 70%	2	
9.	Aqua dest.	25 sec	
10.	HTX-Mayer	8	
11.	Fließendes Leitungswasser	10	
12.	Eosin alkoholisch 1 %	4	
13.	Alkohol 96%	30 sec	
14.	Isopropanol	25 sec	
15.	Isopropanol	25 sec	
16.	Xylol	1,5	
17.	Xylol	1,5	Kann in Xylol stehen bleiben bis zum Eindecken

## 2. Ergebnis:

Kerne blau  
 Übriges Material rosa

## 3. Wechsel der Lösungen

Einmal wöchentlich

### Abbildung 27: HE-Standardprotokoll

Die Schnitte verblieben bis zum Eindecken mit Pertex<sup>®</sup> (Medite Mounting Medium, Medite Cancer Diagnostics, Orlando, USA) in Xylol.

### 8.1.1. Auswertung

Makroskopisch nachgewiesenes Lebergewebe und/oder Knötchen wurden morphologisch nach Theise *et al.* (2010) und Thoolen *et al.* (2010) von zwei erfahrenen Pathologinnen (KS, HY) charakterisiert. Zusätzlich wurden die gefärbten Objektträger mit einem automatischen Objektträgerscanner (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland, AT-2) gescannt und die Aperio Imagescope-Software (Version 12.3, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) wurde zur Aufnahme repräsentativer Bilder verwendet.

### 8.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung der HE-Parallelschnitte erfolgte nach dem in Tabelle 5 dargestellten Protokoll unter Verwendung der vollautomatischen Färbemaschine Bond RX (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) der Abteilung für vergleichende experimentelle Pathologie des Instituts für Pathologie der Fakultät für Medizin der TU München. Hierfür wurden primäre Antikörper gegen CD31 (1:50, abcam 28364) zum Nachweis von Gefäßendothelzellen verwendet. Die Objektträger wurden entparaffiniert und mit Epitope Retrieval Solution 2 (ER2) vorbehandelt. Die Antikörperbindung wurde mit einem Polymer-Refine-Nachweiskit ohne postprimäres Reagenz nachgewiesen und mit Mixed DAB (Diaminobenzidin) Refine als dunkelbrauner Niederschlag sichtbar gemacht. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (0,1 %) und ermöglichte die Darstellung der Zellkerne (blau). Die Objektträger wurden dann manuell durch Alkoholwaschungen mit zunehmender Konzentration (70 %, 96 %, 100 %) und Xylol dehydratisiert und die Abdeckung erfolgte unter Verwendung von Pertex®-Eindeckmedium (Meditate Mounting Medium, Mediate Cancer Diagnostics, Orlando, USA). In jedem Lauf war eine Positivkontrolle enthalten.

**Tabelle 5: Übersicht über verwendete Antikörper und Protokoll einschließlich Ursprung, Hersteller, Verdünnung und Vorbehandlung**

Name	Ursprung	Hersteller	Verdünnung	Vorbehandlung	Protokoll
CD31 abc.	Rabbit	abcam	1:50	ER2/30	IHC Rabbit polymer

Die Vorbehandlung mit ER2/30 beschreibt eine hitzeinduzierte Epitop-Vorbehandlung über einen Zeitraum von 30 min mit EDTA (Ethyldiamintetraacetat) (pH 9). An die Vorbehandlung schloss sich die immunhistochemische CD31-Färbung der Schnitte nach dem Protokoll „IHC Rabbit polymer“ mit folgendem standardisierten Ablauf (siehe Tabelle 6) an:

**Tabelle 6: Schritte, Reagenzien, Lieferanten, Temperatur und Inkubationszeiten des Protokolls „ICH Rabbit polymer“**

Schritt	Reagenz	Lieferant	Temperatur	Inkubation in Min.
1	Peroxide Block	Leica Microsystems	Umgebung	5:00
2	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
3	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
4	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
5	Marker			15:00
6	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
7	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
8	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
9	Polymer			8:00
10	Bond Wash Solution			2:00
11	Bond Wash Solution			2:00
12	Deionisiertes Wasser	Hauseigen	Ca. 1:00	
13	Mixed DAB Refine	Leica Microsystems	Ca. 1:00	
14	Mixed DAB Refine		10:00	
15	Deionisiertes Wasser	Hauseigen	Ca. 1:00	
16	Deionisiertes Wasser		Ca. 1:00	
17	Deionisiertes Wasser		Ca. 1:00	
18	Hematoxylin	Leica Microsystems	5:00	
19	Deionisiertes Wasser	Hauseigen	Ca. 1:00	
20	Bond Wash Solution	Leica Microsystems	00:30	
21	Bond Wash Solution		00:30	

### 8.2.1. Quantifizierung der Vaskularisation mithilfe des positiven Pixel Counts (PPC)

Für die verbesserte Gefäßdarstellung und zur Quantifizierung der Vaskularisation der CD31-Schnitte wurde ein eigens modifizierter positiver Pixelcount v9 der Software Aperio Image Scope Version 12.4.0.7018, Copyright Leica Biosystems Pathology Imaging 2003 - 2018 als softwaregestützte Messmethode für jeden einzelnen Lebertumor sowie angrenzendes Leberparenchym verwendet.

Folgende Parameter wurden für die Modifikation verwendet (siehe Tabelle 7):

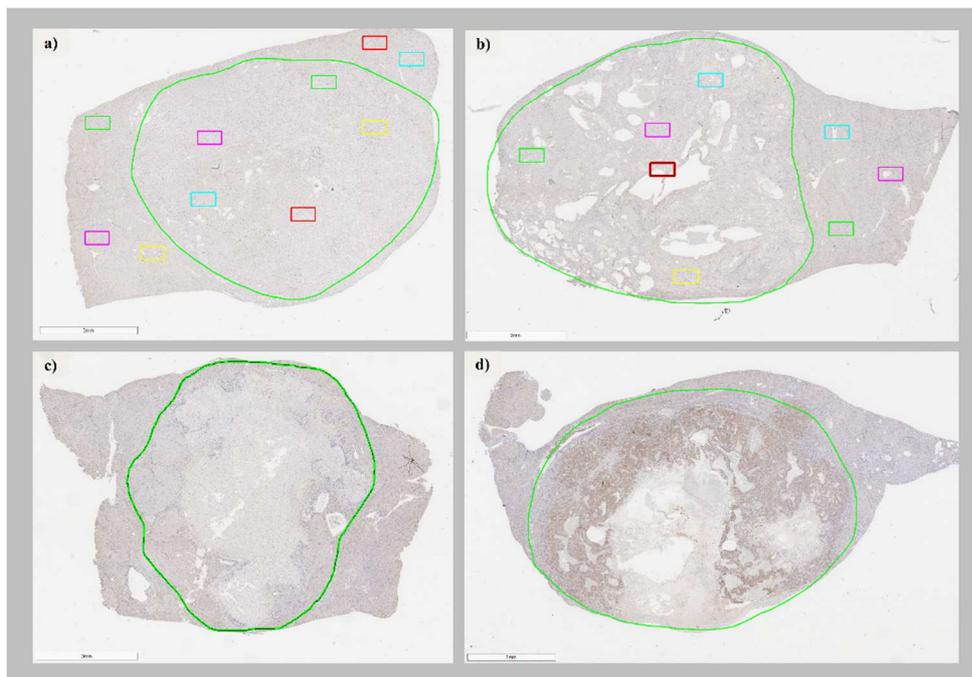
**Tabelle 7: Übersicht der Parameter des modifizierten positiven Pixel Count v9 für die Erfassung der Tumolvaskularisation in der CD31-Färbung**

<b>View Width</b>	1000
<b>View Height</b>	1000
<b>Overlap Size</b>	0
<b>Image Zoom</b>	1
<b>Markup Compression</b>	Same as processed image
<b>Compression Quality</b>	30
<b>Classifier Neighborhood</b>	0
<b>Classifier</b>	None
<b>Class List</b>	
<b>Hue Value</b>	0,1
<b>Hue Width</b>	0,5
<b>Color Saturation Threshold</b>	0,04
<b>Iwp [High]</b>	220
<b>Iwp [Low] = Ip [High]</b>	175
<b>Ip [Low] = Isp [High]</b>	100
<b>Isp [Low]</b>	0
<b>Inp [High]</b>	-1

Die CD31-Positivität in % wurde definiert als Gesamtzahl der positiven Pixel geteilt durch die Gesamtzahl aller Pixel: ( $Positivity = N_{Positive} / N_{Total} \times 100$ ).

Pixel wurden vom Algorithmus als schwach, positiv und stark positiv in den Farben gelb, orange und rot sowie die negativen Pixel blau dargestellt. Hieraus wurde die Positivität als Marker der Vaskularisation nach oben beschriebener Formel berechnet. Da bei der Auswahl des kompletten Tumors als Tumor-ROI auch Bereiche mit beispielsweise schlechter Anfärbung, Nekrosebereichen (siehe Abbildung 28 c, d), Schnittartefakten, Zysten oder Einblutungen nicht oder überdurchschnittlich stark angefärbt dargestellt werden, wurden in jedem HCC 5 ROIs und in der angrenzenden Leber 3 - 5 ROIs (je nach Größe des angrenzenden Lebergewebes) bei 20x-Vergrößerung ausgewählt, in denen eine für Tumor und Leber repräsentative Vaskularisation vorzufinden war (siehe Abbildung 28 a, b).

In den ausgewählten ROIs wurde der PPC angewandt. Der Mittelwert aus den gemessenen ROIs ergab das Ergebnis der Vaskularisation in %.



**Abbildung 28: CD31 mit eingezeichnetem Tumor (grüne Linie) sowie ausgewählter ROIs (bunte Kästen) in Tumor- und angrenzendem Lebergewebe: a) je 5 Tumor- und Leber-ROIs, b) 5 Tumor- und 3 Leber-ROIs; Beispiele ausgeschlossener Proben (c, d) aufgrund großer intratumoraler Nekrosebereiche; Skala 3 µm**

### **8.2.2. Auswertung**

Die Datenverarbeitung und Auswertung erfolgte über Microsoft Excel® und *Prism* Version 9.4.1 (GraphPad Software).

## **9. Massenspektrometrie**

### **9.1. Massenspektrometrische Untersuchung**

Die Bearbeitung der Tumore und Lebergewebe zur massenspektrometrischen Analyse erfolgte am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Westfälische Wilhelms-Universität (WWU) Münster in Kooperation mit der Arbeitsgruppe AK Karst (Prof. Uwe Karst, Rebecca Buchholz, Katharina Kronenberg, WWU Münster, Münster, Deutschland). Hier wurden zum einen durch die sog. Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (LA-ICP-MS) orts aufgelöste Messungen der Elementverteilungen von Gadolinium (Gd) und Platin (Pt) der T1-Tumore sowie zum anderen, die nicht-orts aufgelösten Messungen, mittels der sog. Single-Quadrupol-ICP-MS (SQ-ICP-MS) zur Gesamtgehaltbestimmung der Gd- und Pt-Konzentrationen der Resttumore (T2-T6) etabliert. Außerdem wurden im Zuge der LA-ICP-MS die Elemente Eisen (Fe), Kupfer (Cu), Zink (Zn), und Phosphor (P) ermittelt, da sie wichtige Informationen u.a. zur Gewebemorphologie, Blutversorgung und dem Fibrosegrad liefern können.

### **9.2. Probenvorbereitung und Anfertigung von Leerschnitten**

T1-Tumore und Leberproben wurden mit TissueTek® (Richard-Allen Scientific, San Diego, USA) auf einem Probenträger fixiert. Anschließend wurden mithilfe eines Kryomikrotoms zunächst 10 µm dicke Schnitte angefertigt (Messertemperatur -20 °C, Probenträgertemperatur -17 °C) und anschließend auf einen Glasobjektträger aufgebracht. Zusätzlich wurden lichtmikroskopische Hellfeldaufnahmen der zu ablatierenden Schnitte hergestellt. Bis zur Ablation verblieben die Schnitte im Kühlschrank. Um einen passenden Kryo-HE-Parallelschnitt zu jeder ablatierten Probe zu erhalten, wurde die HE-Färbung an der Klinik für Radiologie des Universitätsklinikums Münster in Auftrag gegeben. Die gefärbten Schnitte wurden anschließend wieder zurück in die Abteilung für vergleichende experimentelle Pathologie des Instituts für Pathologie der Fakultät

für Medizin der Technischen Universität München versandt und dort, wie unter 8.1.1. erläutert, eingescannt.

### **9.3. Quantitatives Elementbioimaging mittels LA-ICP-MS der T1-Tumore**

Da der Probenumfang über den Zeitraum eines Jahres wöchentlich akquiriert wurde, waren eine Doktorandin (Rebecca Buchholz) und eine Masterstudentin (Katharina Kronenberg) der AK Karst mit der Bearbeitung der Proben beauftragt. Die Proben der ersten Kohorte wurden von Frau Buchholz, die Proben der zweiten Kohorte von Frau Kronenberg bearbeitet. Sie werden im Folgenden als erster und zweiter Probenansatz aufgeführt. Hieraus ergaben sich aus beiden Versuchsreihen kleine Unterschiede im Ansatz der Quantifizierung, da hierfür wie bereits unter II.6.2. erläutert keine Standardreferenzmaterialien existieren. Sie erzielten keinen nennenswerten Unterschied im Ergebnis, sollen im Folgenden aber kurz erläutert werden:

Die Quantifizierung für die LA-ICP-MS-Analyse des ersten Probenansatzes wurde über eine externe Kalibrierung basierend auf matrixangepassten Gelatinestandards durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Stammlösungen hergestellt. Die erste Stammlösung enthielt 1000 mg/L Gd (aus  $\text{GdCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ), 1000 mg/L Zn (aus  $\text{ZnCl}_2$ ) und 10000 mg/L Fe (aus  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ). Die zweite Stammlösung enthielt 500 mg/L Cu (aus ICP-Standardlösung, 1000 mg/L) und 500 mg/L Pt (aus ICP-Standardlösung, 1000 mg/L). Jede Stammlösung wurde zu Standards im Bereich von 1 bis 500 mg/L für Gd und Zn, 10 bis 5000 mg/L für Fe und 1 bis 100 mg/L für Cu und Pt verdünnt. Für die matrixangepassten Standards wurden 100  $\mu\text{l}$  der Standards mit 900 mg Gelatine (Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland) gemischt, homogenisiert und auf 60 °C erhitzt. Für die LA-ICP-MS-Analyse wurden 10  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte unter Verwendung eines Kryomikrotoms (NX70, Thermo Fischer, Bremen, Deutschland) erstellt. Zur Validierung der Konzentrationen in den Gelatinestandards wurde nach saurem Aufschluss eine Gesamtgehaltsbestimmung mittels ICP-MS durchgeführt. Es wurden 50 mg jedes Standards in 1 ml konzentrierte Salpetersäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) aufgelöst und nach Zugabe eines internen Standards mit einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{g/L}$  im Aufschluss (Holmium (Ho) für die erste Standardmischung und Rhodium (Rh) für die zweite Standardmischung) auf 50 ml mit doppelt destilliertem Wasser ( $\text{ddH}_2\text{O}$ )

aufgefüllt. Die Quantifizierung für die Gesamtgehaltsbestimmung wurde unter Verwendung einer externen Kalibrierung durchgeführt, wobei ICP-Standardlösungen für alle fünf Elemente in einem Bereich zwischen 0 und 30 µg/L verdünnt wurden. Für das elementare Bioimaging mittels LA-ICP-MS-Analyse wurden 10 µm dünne Schnitte des Tumor- und Lebergewebes unter Verwendung des zuvor beschriebenen Kryomikrotoms hergestellt. Für die Analyse wurde ein LSX 213 G2+ Laserablationssystem (CETAC Technologies, Omaha, USA) verwendet, das mit einer Two-volume HelEx II-Zelle ausgestattet war und über einen Tygon-Schlauch mit einem ICPMS-2030 (Shimadzu, Kyoto, Japan) verbunden war. Zehn Linien jedes Gelatinestandard wurden ablatiert und die gemittelten Intensitäten wurden mit den validierten Elementkonzentrationen für die externen Kalibrierungen verwendet. Die Tumor- und Leberproben wurden über einen zeilenweisen Scan ablatiert. Sowohl für Proben als auch für Standards wurde eine Spotgröße von 25 µm, eine Scangeschwindigkeit von 75 µm/s und 800 mL/min He als Transportgas verwendet. Die Laserenergie wurde angepasst, um eine quantitative Ablation sicherzustellen. Die Analyse wurde im Kollisionsgasmodus mit He als Kollisionsgas und einer Integrationszeit von 45 ms für die Isotope <sup>31</sup>P, <sup>57</sup>Fe, <sup>65</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>194</sup>Pt, <sup>158</sup>Gd, und <sup>160</sup>Gd durchgeführt.

Die Standards zeigten eine ausreichende Linearität mit  $R^2 \geq 0.995$  über den analysierten Konzentrationsbereich. Die Nachweisgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOQ), berechnet nach Boumans betragen 2,3 ng/g und 7,6 ng/g für Pt, 3,0 ng/g und 10 ng/g für Gd, 1,2 µg/g und 4,1 µg/g für Fe 0,10 µg/g und 0,34 µg/g für Cu bzw. 0,35 µg/g und 1,2 µg/g für Zn.

Zur Quantifizierung für die LA-ICP-MS-Analyse des zweiten Probenansatzes wurde eine ähnliche Vorgehensweise gewählt. Geringe Abweichungen ergaben sich wie folgt:

- Bei der Herstellung der matrixangepassten Gelatinestandards wurde die erste Stammlösung zu Standards im Bereich von 10 bis 500 mg/L für Gd und Zn sowie 100 bis 5000 mg/L für Fe und die zweite Stammlösung 1 bis 100 mg/L für Cu und Pt verdünnt.
- Zur Validierung der Gelatinestandards wurde bei den Gesamtgehaltsbestimmungen nach saurem Aufschluss 50 mg jedes Standards in 0,5 mL Salpetersäure (konz.) aufgelöst und nach Zugabe von Rh als internen Standard mit einer Endkonzentration von 1 µg/L im

Aufschluss auf 50 ml mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

- Beim elementaren Bioimaging mittels LA-ICP-MS-Analyse wurden sowohl für Proben als auch für Standards eine Spotgröße von 25 µm und eine Scangeschwindigkeit von 50 µm/s eingestellt. Die Analyse wurde im Kollisionsgasmodus mit He als Kollisionsgas durchgeführt, wobei bei den Leberproben eine Integrationszeit von 50 ms für das Isotop <sup>31</sup>P, 75 ms für die Isotope <sup>65</sup>Cu sowie <sup>66</sup>Zn und 100 ms für die Isotope <sup>195</sup>Pt, <sup>158</sup>Gd und <sup>57</sup>Fe gewählt wurde. Bei den Tumorproben wurde über einen Flüssigeintrag eine 1 µg/L Ho- und Sc-(Scandium)-Lösung (aus ICP-Standardlösung, 1000 mg/L) in einer Matrix aus 1%iger Salpetersäure eingetragen, um Plasmaschwankungen zu überwachen. Bei den Tumorproben wurden folgende Integrationszeiten für die verschiedenen Isotope gewählt: 80 ms für <sup>195</sup>Pt und <sup>158</sup>Gd, 100 ms für <sup>57</sup>Fe, 75 ms für <sup>65</sup>Cu und <sup>66</sup>Zn, 40 ms für <sup>31</sup>P sowie 25 ms für <sup>45</sup>Sc und <sup>165</sup>Ho.
- Die ablatierten Gelatinestandards zeigten eine ausreichende Linearität mit  $R^2 \geq 0.989$  über den analysierten Konzentrationsbereich. Die Nachweisgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOQ), berechnet nach Boumans, betragen je nach Messserie: 78 - 91 ng/g und 260 - 300 ng/g für Pt, 66 - 150 ng/g und 220 - 480 ng/g für Gd, 12 - 42 µg/g und 40 - 140 µg/g für Fe, 2,4 µg/g und 8,1 µg/g für Cu bzw. 9,2 µg/g und 31 µg/g für Zn.

#### **9.4. Gesamtgehaltbestimmung mittels SQ-ICP-MS der Resttumore (T2-T6)**

Die Gesamtgehalte von Gd und Pt in T2- bis T6-Tumoren wurden über einen sauren Aufschluss und die Quantifizierung mit externer Kalibration mittels SQ-ICP-MS ermittelt. Hierfür mussten die Tumorproben zunächst vom umgebenden Lebergewebe freipräpariert werden, da dieses für die Messungen der LA-ICP-MS zur Orientierung zwischen Tumorregion, peritumoralem Bereich und angrenzendem Lebergewebe nicht entfernt wurde, nun aber bei der Gesamtgehaltbestimmung der Elementgehalte nicht mehr erwünscht ist bzw. die Messwerte verfälschen würde. Da dieses Freipräparieren an der Kryoprobe vollzogen werden musste, kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden, dass sich noch Leberrestgewebe an den Tumoren befand.

Die Tumorproben wurden mit konzentrierter Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>) aufgeschlossen, wobei die Menge individuell für jeden Tumor angepasst werden musste ( $\leq 0,5$  ml), um die teils weniger als 50 mg schweren Tumorproben nicht zu stark zu verdünnen.

Entsprechend ihres Gewichts und der Menge des verwendeten HNO<sub>3</sub>-Volumens wurden die Tumoraufschlüsse mit entsprechend viel Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 34,5 - 36,5 %, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) versetzt, sodass sich ein Verhältnis von 1:5 ergab. Bei 80 °C wurden die Aufschlüsse so lange erhitzt, bis die Proben vollständig aufgelöst waren. Anschließend wurden sie 1:100 verdünnt, wobei Rh als interner Standard mit einer Endkonzentration von 1 µg/L hinzugefügt wurde. Die externe Kalibration wurde mit Standardlösungen aus ICP-MS Standards (siehe Tabelle 8) hergestellt und mit aufsteigender Konzentration vor den Gewebeaufschlüssen gemessen. Die Integrationszeit der ICP-MS-Messung für die Isotope (<sup>158</sup>Gd, <sup>195</sup>Pt und <sup>103</sup>Rh) betragen 100 ms. Gemessene Intensitäten wurden für die Quantifizierung auf die Intensität von Rh normiert.

**Tabelle 8: Übersicht bei LA-ICP-MS und SQ-ICP-MS verwendeter interner Standards inkl. Eigenschaften und Herstellerangaben**

Standard	Eigenschaften	Hersteller
<b>Gd-ICP-Standard</b>	1000 mg/L in 5 % HNO <sub>3</sub>	Thermo Fisher GmbH, Kandel, Deutschland
<b>Pt-ICP-Standard</b>	1000 ± 3 mg/L in 5% HCl	High Purity Standards, Charleston, USA
<b>Fe-ICP-Standard</b>	1000 mg/L ± 0,2 % in 2% HNO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Cu-ICP-Standard</b>	1000 mg/L ± 0,2 % in 2 % HNO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Zn-ICP-Standard</b>	1000 mg/L ± 0,2 % in 2 % HNO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Sc-ICP-Standard PlasmaCAL</b>	1000 mg/L in 4 % HNO <sub>3</sub>	SCP SCIENCE, Baie D'Urfé, Canada
<b>Ho-ICP-Standard PlasmaCAL</b>	1000 mg/L in 4 % HNO <sub>3</sub>	SCP SCIENCE, Baie D'Urfé, Canada
<b>Rh-ICP-Standard</b>	1000 mg/L ± 0,5 % in HCl	SCP Science, Baie D'Urfé, Canada

## 9.5. Auswertungen

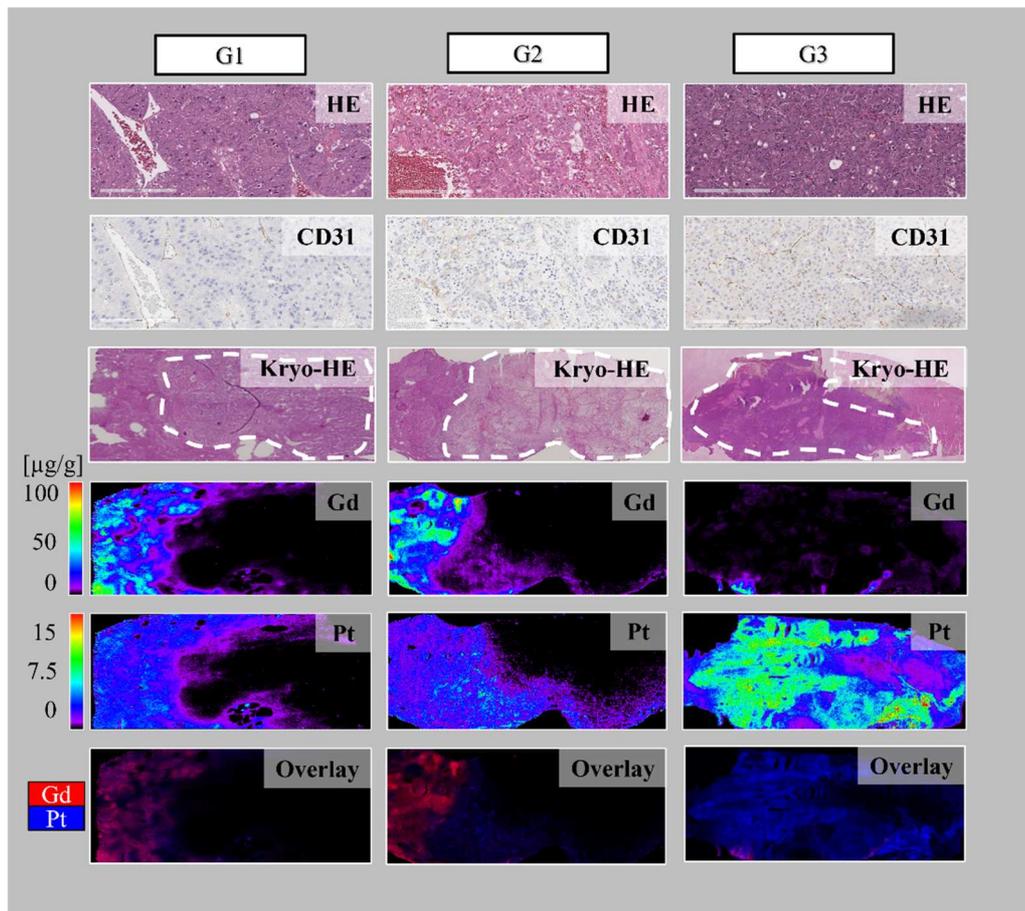
Die Quantifizierung und Visualisierung erfolgte mit einer der WWU Münster eigens entwickelten Software, genannt *ImaJar* (Version 3.64b) (Robin Schmid, WWU Münster, Münster, Deutschland). Um alle Proben makroskopisch miteinander vergleichen zu können, wurde als Standardeinstellung der Maximalwerte für Gd, Cu, und Zn 100 µg/g, für Pt 15 µg/g und für Fe 1000 µg/g gewählt. Es handelt sich bei den ermittelten Messwerten um Mittelwerte der Elementkonzentrationen für Gd, Pt, Fe, Cu und Zn in µg/g sowie deren Standardabweichungen.

### 9.5.1. Fibrosegrad

Der Fibrosegrad der Lebern wurde über das Staging-System nach Desmet und Scheuer (Grad 0-4) eingeteilt. Dieser wurde anhand der morphologischen Veränderungen der Hintergrundleber in der Kryo-HE sowie der LA-ICP-MS-Eisen-(Fe)-Messung bestimmt, indem die LA-ICP-MS-Fe parallel zu den Kryo-HE-Schnitten semiquantitativ ausgewertet wurde.

### 9.5.2. LA-ICP-MS der T1-Tumore und Lebern

Nach Ermittlung der verschiedenen Elementkonzentrationen für Gd, Pt, Fe, Cu, Zn (quantitativ) sowie P (qualitativ) aller Tumor- und Leberproben über *ImaJar* erfolgte anschließend die Aufteilung der Proben nach Entnahmezeitpunkten (10, 15 - 20, 30, 60 min) und Grading (G1, G2, G3). Für die Auswertung wurden stets alle verfügbaren Schnitte (HE, CD31, Kryo-HE, LA-ICP-MS-Gd/Pt) parallel untersucht, um Tumorbereiche vom umgebenden Lebergewebe abzugrenzen und etwaige morphologische Auffälligkeiten pathohistologisch und massenspektrometrisch vergleichen zu können (siehe Abbildung 29). Die Beurteilung der Kryo-HE-Färbung erfolgte in Abstimmung mit einer erfahrenen Pathologin (KS).



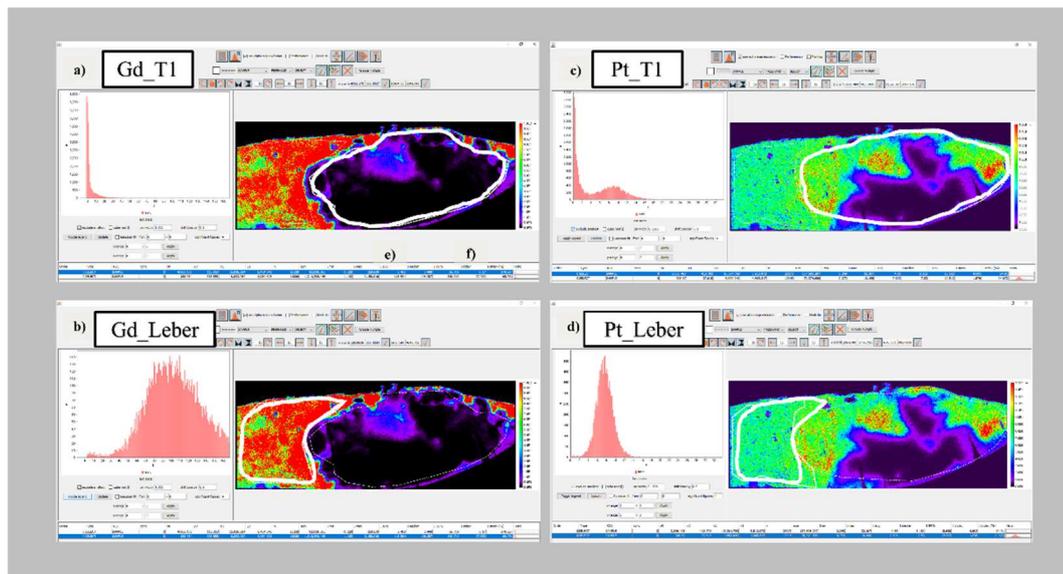
**Abbildung 29: Gegenüberstellung eines G1 (links), G2 (mittig) und G3 (rechts) HCCs (von oben nach unten: HE, CD31, Kryo-HE mit markiertem T1 (weiß gestrichelte Linie), LA-ICP-MS-Gd, LA-ICP-MS-Pt mit Darstellung der schwachen (lila/dunkelblau) bis starken (hellgrün) Cisplatin- Anreicherung im Tumorgewebe sowie einem Überlagerungsbild (Overlay) von Gd (rot) und Pt (blau)**

Im Überlagerungsbild (Overlay) von Gd (rot) und Pt (blau) wird die Überlagerung beider Elemente (lila) dargestellt, um deren Verteilung im Tumor- und angrenzenden Lebergewebe zu veranschaulichen.

Da nach den ersten durchgeführten LA-ICP-MS-Messungen bei einem Entnahmezeitpunkt nach 15 min gute Anreicherungen im Tumorgewebe festgestellt wurden, ist die Anzahl der Tumore, die zu diesem Zeitpunkt entnommen wurden, mit 11 Proben am größten. Daher wird auf diese Gruppe im folgenden Ergebnisteil gesondert eingegangen. Für die LA-ICP-MS-Auswertung erfolgte nach Abgleich mit der Kryo-HE sowohl die manuelle Einzeichnung einer einzelnen großen Tumor-ROI, die den kompletten Tumor umrandete (siehe Abbildung 30

a, c) als auch die Einzeichnung mehrerer kleinerer ROIs (1-5), die in Bereiche des Tumors mit auffälligen Konzentrationen gelegt wurden, um nicht nur einen Mittelwert der gesamten Tumorregion, sondern auch die Mittelwerte der kleineren ROIs, die zum Teil deutlich höhere Pt-Konzentrationen als der Gesamttumor aufzuweisen hatten, zu generieren.

Für die weitere Datenverarbeitung wurden die aus den ROIs ermittelten Durchschnittsgehalte  $I_{avg}$  sowie deren Standardabweichungen  $I_{stdev}$  verwendet (siehe Abbildung 30 e, f). Die numerischen Daten jedes Pixels wurden als Intensität in Microsoft Excel® exportiert und dort ausgewertet. Die graphische Histogrammdarstellung erfolgte über *Prism*, da ein direkter Export aus *ImaJar* nicht möglich war.



**Abbildung 30: Screenshot eines über die *ImaJar* Software dargestellten Tumors mit Einzeichnung einer ROI im Tumor für Gd (a) und Pt (c) sowie in der angrenzenden Leber für Gd (b) und Pt (d) inkl. Histogrammdarstellung und Intensitäten für die gemessenen ROIs mit e)  $I_{avg}$  und f)  $I_{stdev}$**

Die P-Messung erfolgte qualitativ zur Darstellung der Grundstruktur des untersuchten Gewebes. Die Fe-, Cu- und Zn-Proben wurden quantitativ ausgewertet, indem die ROIs manuell in Tumor- und Lebergewebe in die verschiedenen LA-ICP-MS-Bilder in *ImaJar* eingezeichnet wurden.

### 9.5.3. SQ-ICP-MS der Resttumore (T2-T6)

Da nicht für alle entnommenen Tumorproben orts aufgelöste LA-ICP-MS Messungen durchgeführt werden konnten, da diese sehr zeitaufwendig sind, wurden für die 31 Resttumore (T2-T6) Gd- und Pt-Gesamtgehalte ermittelt. Dabei handelte es sich um zwei G1, sieben G2 sowie 22 G3 HCCs. Zu bedenken ist, dass sich zur Orientierung im LA-ICP-MS-Bild immer ein kleiner Bereich angrenzender Leber an der Tumorprobe befinden musste. Dieser wurde nachträglich bestmöglich von den Kryoproben der Resttumore freipräpariert mit dem Ziel, nur Tumorgewebe in die Gesamtgehaltmessung aufzunehmen.

Es kann nicht garantiert werden, dass sich nach der Präparation keinerlei Leberrestgewebe mehr an den Tumoren befand. Dadurch können die folgenden Ergebnisse falsch hohe Gd- und Pt- Konzentrationen aufweisen, worauf im jeweiligen Kontext detaillierter eingegangen wird.

### 9.5.4. Kontrolltiere ohne Pt-Injektion

Den Kontrolltieren (n = 5) wurde am Tag vor der Angiographie während des DCE-MRTs das Gd-haltige Kontrastmittel Primovist® verabreicht. Als Negativkontrolle erfolgte bei ihnen die LA-ICP-MS für Gd, Pt, Fe, Cu, Zn und P.

## 10. Statistik

Die Normalverteilungsprüfung erfolgte mit dem *Pearson-D'Agostino omnibus K2-test*. Der *Student's t-test* wurde für Mittelwertsvergleiche angewendet. Korrelationen nicht normalverteilter Variablen erfolgten mit *Spearman's r<sub>s</sub>*. Es wurde ein zweiseitiges Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt. Alle statistischen Analysen wurden mit Microsoft Excel® und *Prism* Version 9.4.1 (GraphPad Software) durchgeführt.

## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Pathohistologie**

Von allen HCCs (n = 64) dieser Studie wurden zur Bestimmung des Gradings sowie der Vaskularisation eine HE- sowie eine CD31-Färbung angefertigt (exemplarische Ausschnitte von G1-G3 HCCs bei 20x Vergrößerung siehe Abbildung 31). Von allen 21 T1-Tumoren wurden auswertbare HE-Schnitte angefertigt. Ein T1 CD31-Schnitt sowie acht T2-T6-CD31-Schnitte mussten aufgrund von Färbe- und Schnittartefakten oder zu großen Nekrosebereichen ausgeschlossen werden.

#### **1.1. Grading**

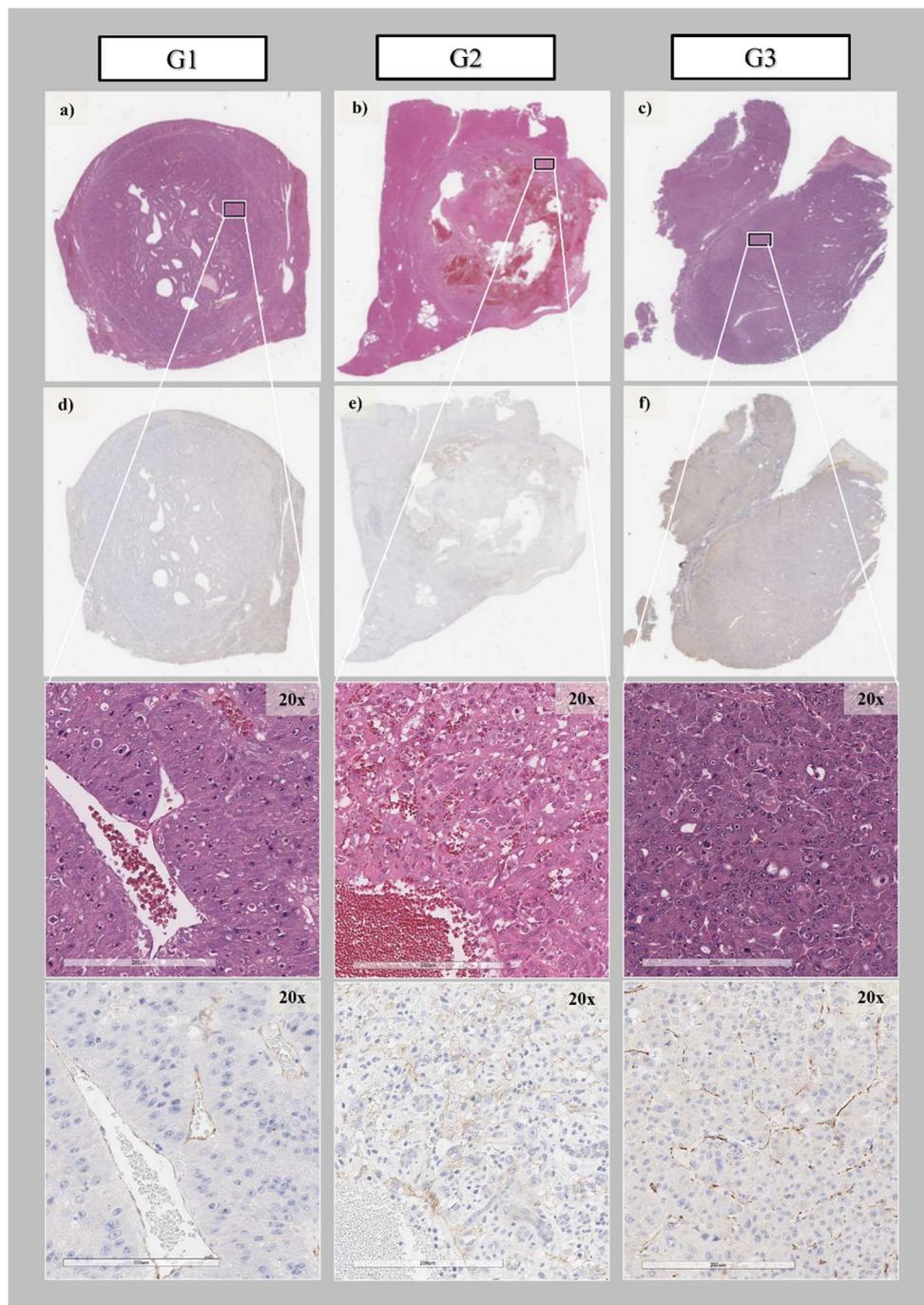
Neben acht Tumoren, die der Entität nach nicht dem HCC zugeordnet werden konnten, da es sich um andere Tumore (Adenokarzinom, cholangiozelluläres Karzinom) oder eine HCC-Vorstufe (FCA) handelte, fanden sich in den übrigen Tumoren (n = 64) typische HCC-Charakteristika in der HE-Färbung. Sie zeigten solide (42 %), gemischt trabekulär-solide (36 %) und trabekuläre (22 %) Wachstumsmuster. Von den 72 zu beurteilenden Tumoren ergab sich nach dem pathohistologischen Grading in ein G1, G2 oder G3 HCC folgende Aufteilung:

G1: n = 4, G2: n = 15, G3: n = 45, kein HCC: n = 8. Damit war das G3 HCC mit knapp 70,31 % am häufigsten vertreten. Danach folgten G2 mit 23,44 und G1 mit 6,25 %.

#### **1.2. Morphologische Veränderungen**

G1 HCCs zeigten deutlich weniger zelluläre Atypien und atypische Mitosen als G2 und G3 HCCs, deren Tumorzellen eine deutliche Pleomorphie aufwiesen. In vielen Zellen waren unterschiedlich große Vakuolen nachzuweisen, was mit einer für das HCC typischen Verfettung der Tumorzellen einhergeht. Im Vergleich zum schmal-trabekulären Wachstumsmuster früher HCCs konnten beim fortgeschrittenen HCC neben dem soliden Wachstumsmuster deutliche Architekturveränderungen im Sinne einer Verdrehung der Trabekel beobachtet werden. In vielen HCCs waren neben großflächigen Nekrosebereichen und Zonen mit intratumoraler Fibrose, dilatierte Sinusoide und Gallengänge erkennbar.

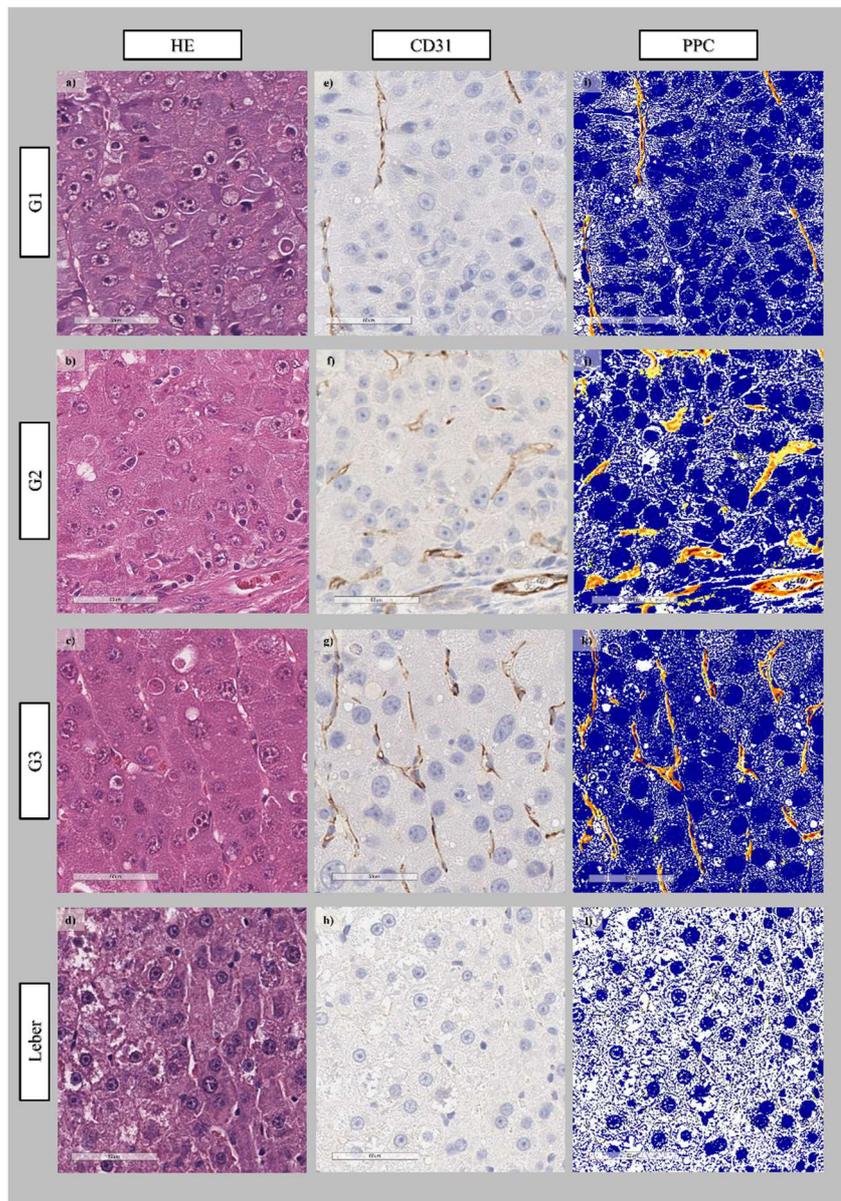
Diese Veränderung stellen allesamt Folgen der massiven Umbauprozesse der chronisch kranken Leber dar.



**Abbildung 31: HE-Färbung (a-c) und CD31-Färbung (d-f) eines G1, G2 und G3 HCCs mit 20x-Vergrößerungen**

### 1.3. Beurteilung der Vaskularisation mittels Immunhistochemie

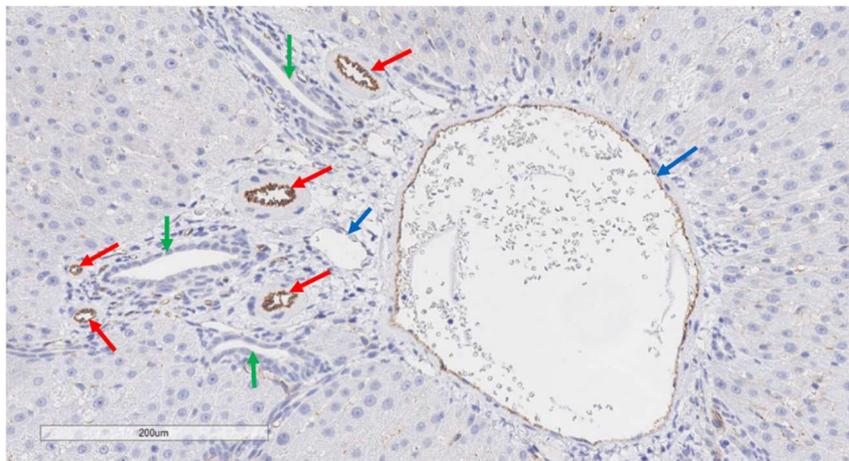
Insgesamt wurden 55 T1- bis T6-CD31-Färbungen von den insgesamt 64 HCCs und 46 angrenzende Leberproben verwendet, um die Vaskularisation genauer zu untersuchen. Bei der Quantifizierung der Gefäße mittels positivem Pixel Count wiesen G3 Tumore eine höhere Vaskularisation als G1 und G2 Tumore sowie die angrenzende Leber auf (siehe Abbildung 32).



**Abbildung 32: HE (a-d) und CD31 (e-h) mit entsprechendem Positivem Pixel Count (PPC) (i-l) zur Visualisierung der Vaskularisation eines G1, G2 und G3 HCCs sowie Lebergewebes bei 40-facher Vergrößerung (Skala 60 µm)**

In Abbildung 32 sind die in der CD31-Färbung bräunlich angefärbten Gefäße, die je nach Intensität der Anfärbung im PPC gelb, orange oder rot erscheinen, zu sehen. Das Gewebe, das keine CD31-Positivität aufweist, erscheint blau.

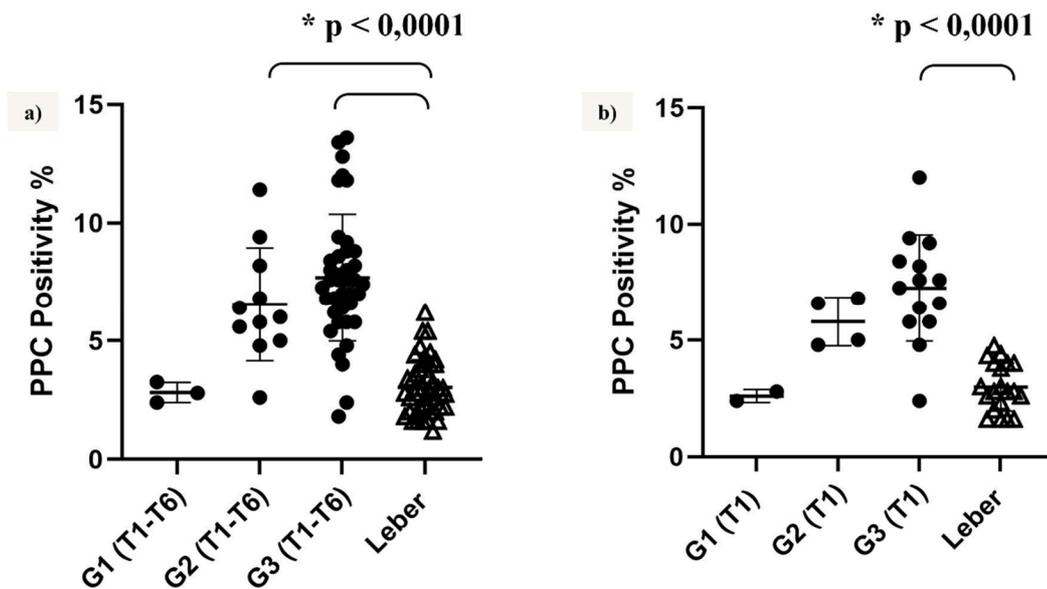
Arterien stellten sich in der CD31-Färbung als dunklere, stärker angefarbte Strukturen mit einer typischen Wandstruktur im Gegensatz zu den dünnwandigeren, schwächer angefärbten Venen, dar. Gallengänge wiesen weder eine CD31-Positivität noch eine Wandstruktur auf (siehe Abbildung 33).



**Abbildung 33: Darstellung der Gefäße eines peritumoralen Areals mit dunkel angefärbten dickwandigen Arterien (rote Pfeile), heller angefärbten dünnwandigen Venen (blaue Pfeile) sowie Gallengängen (grüne Pfeile) ohne CD31-Positivität bei 20x-Vergrößerung**

#### **1.4. Korrelationen von Grading (HE) und Vaskularisation (CD31)**

Durchschnittlich wurden in G1 4,46 %, in G2 6,54 % und in G3 Tumoren 8,04 % der Fläche farbig markiert, was den in diesem Ausschnitt enthaltenen Prozentsatz an CD31 Färbung entspricht. Das angrenzende Leberparenchym zeigte mit einem Mittelwert von 3,11 % gegenüber dem hochgradig arteriell versorgten HCC eine deutlich geringere Färberate. G3 wiesen gegenüber G2 und G1 HCCs sowie dem Lebergewebe eine höhere Positivität und damit Vaskularisation auf. Die Vaskularisation der T1 G3 HCCs unterscheidet sich, genauso wie die der T1-T6 G2 und G3 HCCs, signifikant ( $p < 0,0001$ ) vom Lebergewebe (siehe Abbildung 34 a, b).



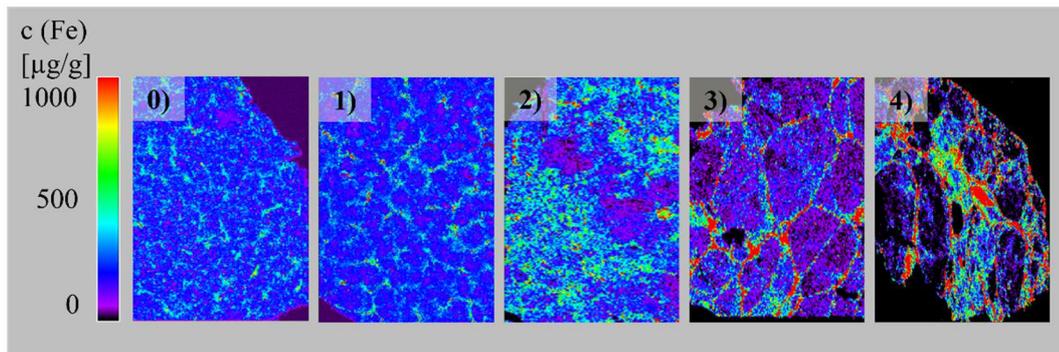
**Abbildung 34: Gruppierung der Positivity in % aus PPC nach Grading für T1-T6 HCCs und Leber (a) sowie T1 HCCs und Leber (b); dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung; \*signifikanter Unterschied zwischen G2 und G3 HCCs und Leber (a) sowie zwischen G3 HCCs und Lebergewebe (b) mit  $p < 0,0001$**

## 2. Massenspektrometrie

### 2.1. Fibrose-Staging

Da nicht jede Tumorprobe von ausreichend beurteilbarem Lebergewebe umgeben war und nur zu den T1-Tumoren orts aufgelöste Gadoliniumwerte für die spätere Korrelation vorlagen, reduzierte sich der zu untersuchende Probenumfang auf 16 Leberproben (Entnahmezeitpunkt bis 20 min).

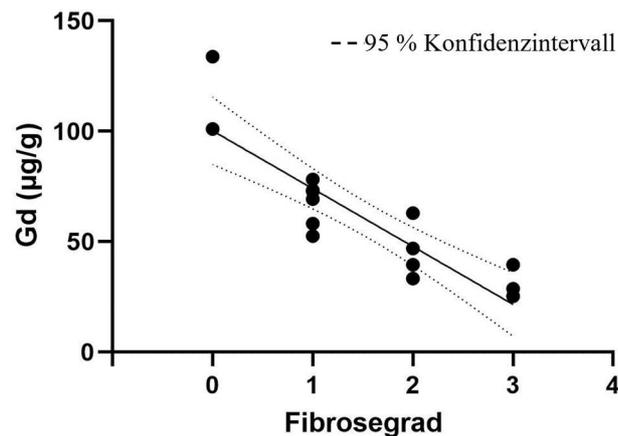
Keine Fibrose (Grad 0) war in 12,5 % der Proben nachzuweisen. Grad 1, bei dem es zu einer portalen Faservermehrung ohne Septenbildung kommt, war mit 37,5 % der am häufigsten vertretene Fibrosegrad. Demgegenüber waren Grad 2 (31,25 %) unter Ausbildung von Fasersepten (inkomplett oder komplett) bei erhaltener Leberarchitektur und Grad 3 (18,75 %) mit einer deutlichen Architekturstörung und einer eindrücklichen, septenbildenden Faservermehrung seltener vorzufinden (siehe Abbildung 35 Grad 0-4).



**Abbildung 35: Desmet/Scheuer-Score (Grad 0-4) zur Fibrosegradbestimmung der Hintergrundleber mithilfe der LA-ICP-MS-Eisenmessung**

### 2.1.1. Korrelation von Fibrosegrad und Gd-Aufnahme

Da mit steigendem Fibrosegrad weniger funktionsfähige Hepatozyten, die das hepatozytenspezifische Kontrastmittel Primovist® aufnehmen können, vorliegen, sinkt mit steigendem Fibrosegrad die Gd-Konzentration. In der Rangkorrelation nach Spearman zeigt sich eine negative Korrelation, die eine starke statistische Signifikanz aufweist ( $r_s = -0,8840$ ,  $p < 0,001$ ;  $n = 16$ ) (siehe Abbildung 36). Im ausgewerteten Probenumfang lag eine Grad 4 Zirrhose nicht vor.



**Abbildung 36: Korrelation der Gd-Konzentrationen des nicht-tumorösen Lebergewebes in  $\mu\text{g}$  mit dem Fibrosegrad ( $r_s = -0,8840$ ,  $p < 0,001$ ;  $n = 16$ )**

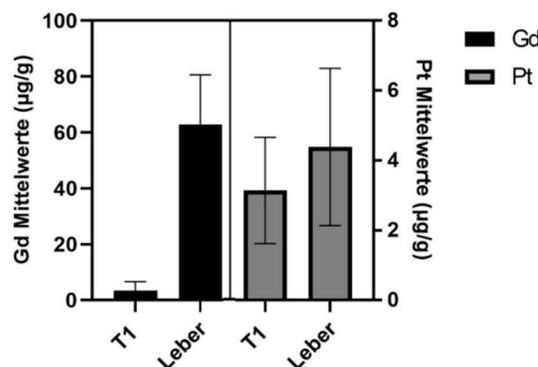
## 2.2. LA-ICP-MS der T1-Tumore

Nachdem die Zeitpunkte der Entnahme der Tumore nach erfolgter Kontrastmittel- und Cisplatininjektion variieren, wird im Folgenden gesondert auf diese sowie auf das unterschiedliche Tumorgrading eingegangen. Zum Abschluss erfolgt die Gegenüberstellung der Kontrolltiere, die weder gadoliniumhaltiges Kontrastmittel noch Cisplatin erhielten.

Im Folgenden wird auf die Auswertung der 21 T1-Tumore (siehe Anhang Abschnitt 1) sowie Leberproben eingegangen.

### 2.2.1. Auswertung aller Proben zu allen Zeitpunkten unter Einbeziehung des kompletten T1-Tumors

In den T1-Proben wurden Gd-Konzentrationen von  $3,37 \pm 3,25 \mu\text{g/g}$  gemessen, im Lebergewebe dagegen durchschnittlich  $62,91 \pm 17,75 \mu\text{g/g}$ . Die Pt-Konzentrationen lagen mit  $3,14 \pm 1,52 \mu\text{g/g}$  in den T1-Proben ebenfalls unter denen des Lebergewebes mit  $4,39 \pm 2,25 \mu\text{g/g}$  (siehe Abbildung 37). Damit enthält die Leber signifikant höhere Gd-Konzentrationen ( $p < 0,0001$ ) im Vergleich zu den T1-Tumoren. Die Pt-Konzentrationen sind in der Leber ( $p = 0,0756$ ) gegenüber den T1-Tumoren nicht signifikant höher.



**Abbildung 37: Gegenüberstellung der ermittelten Gd- und Pt-Mittelwerten ( $\mu\text{g/g}$ ) von T1-Tumoren und Lebergewebe, dargestellt mit Standardabweichung**

### 2.2.2. Auswertung nach Zeitpunkten und Grading unter Einbeziehung des kompletten T1-Tumors

Während der unterschiedlichen Zeitpunkte ist derselbe Trend, wie unter 2.2.1. beschrieben, erkennbar. Die Gd-Konzentrationen sind in der Leber signifikant höher als im Tumorgewebe ( $p < 0,05$ ), die Pt-Konzentrationen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen Leber und Tumorgewebe ( $p > 0,05$ ) (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9: Übersicht der gemessenen Mittelwerte inkl. Standardabweichung der Gd- und Pt-Konzentrationen in Lebergewebe und T1-Tumoren nach Grading und Entnahmezeitpunkt (Grad 1 und 2 sind aufgrund der geringen Probenzahl zusammengefasst dargestellt)**

Zeitpunkt (min)	10		15 - 20		30		60	
	Gd µg/g	Pt µg/g	Gd µg/g	Pt µg/g	Gd µg/g	Pt µg/g	Gd µg/g	Pt µg/g
<b>HCC Grad 1/2</b>	5,88 ± 8,49 (G2 2x)	2,42 ± 1,66 (G2 2x)	1,43 ± 1,85 (G1 1x, G2 2x)	1,01 ± 0,75 (G1 1x, G2 2x)	-	-	3,5 ± 2,35 (G1 1x)	5,15 ± 1,01 (G1 1x)
<b>HCC Grad 3</b>	5,00 ± 5,18 (G3 2x)	2,05 ± 0,8 (G3 2x)	3,29 ± 2,51 (G3 9x)	3,58 ± 1,50 (G3 9x)	3,77 ± 3,16 (G3 3x)	3,83 ± 2,48 (G3 3x)	0,38 ± 1,03 (G3 1x)	5,1 ± 2,72 (G3 1x)
<b>Leber</b>	70,16 ± 22,24	3,33 ± 0,97	75,02 ± 20,43	4,18 ± 2,88	39,77 ± 11,55	5,27 ± 1,67	10,51 ± 1,97	6,48 ± 1,88

\* Probenanzahl in () vermerkt; G1 n = 2, G2 n = 4, G3 n = 15

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich, dass die Gd-Konzentration abnimmt, die Pt-Konzentration hingegen ansteigt sowie, dass das Lebergewebe höhere Pt-Konzentrationen als die T1-Tumore aufweist. Darüber hinaus unterscheiden sich die Gd-Konzentrationen von Leber und Tumorgewebe initial fast um den Faktor 10, wohingegen bei Pt deutlich geringere Unterschiede nachweisbar sind (siehe Abbildung 38 und Abbildung 39).

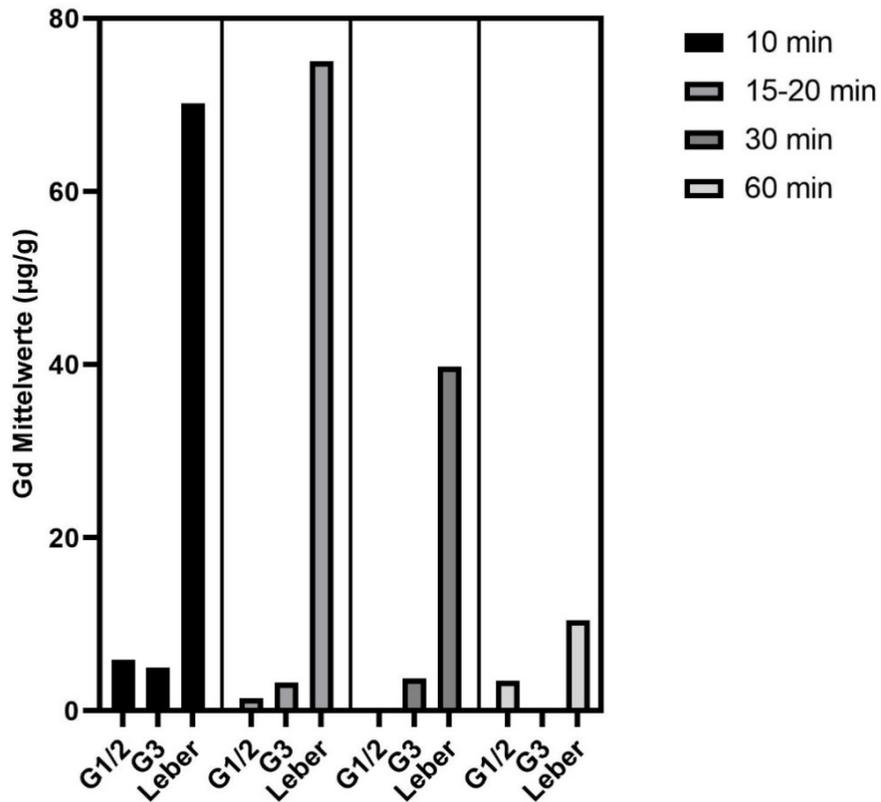


Abbildung 38: Gegenüberstellung der Gd-Mittelwerte (µg/g) aus Tabelle 9 von T1-Tumoren (G1/2 und G3) und Lebergewebe im zeitlichen Verlauf

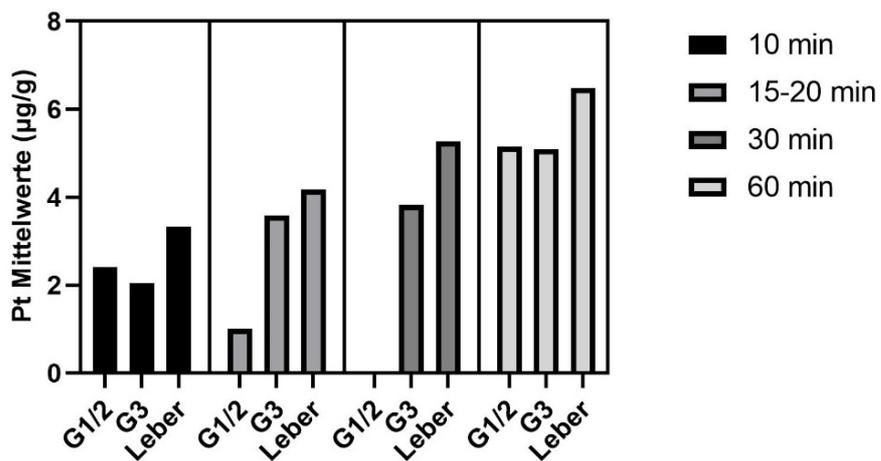


Abbildung 39: Gegenüberstellung der Pt-Mittelwerte (µg/g) aus Tabelle 9 von T1-Tumoren (G1/2 und G3) und Lebergewebe im zeitlichen Verlauf

Nachfolgend wird auf die Analyse der Proben zum Entnahmezeitpunkt nach 15 min eingegangen, um die Elementverteilung orts aufgelöst detaillierter zu untersuchen. Dabei handelt es sich bei 9 Proben um G3 HCCs, bei jeweils einer um ein G1 und ein G2 HCC.

### 2.2.3. Auswertung nach Entnahmezeitpunkt von 15 min und Grading unter Auswahl verschiedener Hotspots in T1-Tumoren

Da zum Entnahmezeitpunkt nach 15 min am meisten Probenmaterial (11 von 21 T1-Proben) entnommen wurde, wurden diese Proben mit einer regionalen Subanalyse betrachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 für eingezeichnete ROIs in den jeweiligen Tumorbereichen aufgeführt. Da von diesen 11 T1-Proben neun ein G3 Grading aufwiesen, konnten für diese Gruppe deutlich mehr ROIs eingezeichnet werden als nur in den beiden G1 und G2-T1-Proben.

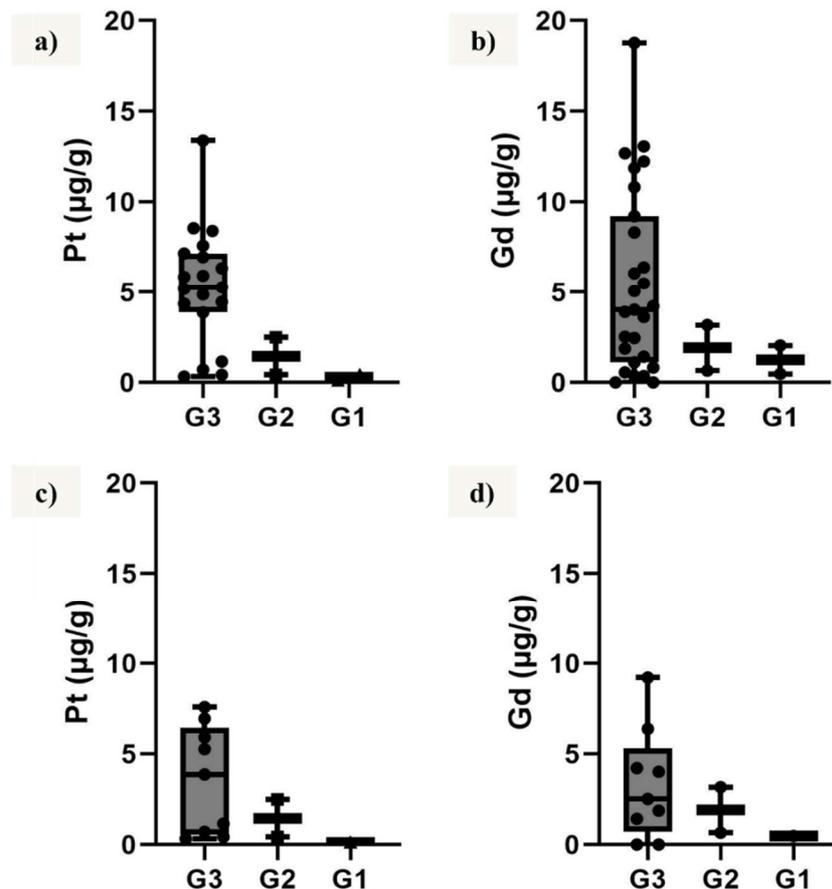
**Tabelle 10: Übersicht der gemessenen Mittelwerte inkl. Standardabweichung der Gd- und Pt-Konzentrationen in Lebergewebe und T1-Tumoren nach Grading und Entnahmezeitpunkt von 15 min (Grad 1 und 2 sind aufgrund der geringen Probenzahl zusammengefasst worden)**

Zeitpunkt (min)	15	
Element	Gd µg/g	Pt µg/g
HCC Grad 1/2	1,89 ± 2,08 (G1 2 ROIs G2 1 ROI)	1,01 ± 0,78 (G1 2 ROIs G2 1 ROI)
HCC Grad 3	5,76 ± 4,50 (G3 19 ROIs)	5,30 ± 1,75 (G3 19 ROIs)
Leber	64,04 ± 19,77 (31 ROIs)	4,13 ± 1,91 (31 ROIs)

\*ROI-Anzahl in () vermerkt; G1 n = 1, G2 n = 1, G3 n = 9

In der Untersuchung verschiedener Hotspots (ROIs) in vitalem Tumorgewebe (siehe Abbildung 40 a-d) konnten mit durchschnittlich  $5,30 \pm 1,75$  µg/g im Tumorgewebe der G3 HCCs deutlich höhere Pt-Konzentrationen als in G1 und G2 Tumoren (a) nachgewiesen werden. Die Gd-Konzentration (b) lag in G3 HCCs bei  $5,76 \pm 4,50$  µg/g und damit ebenso über denen der G1 und G2 HCCs mit

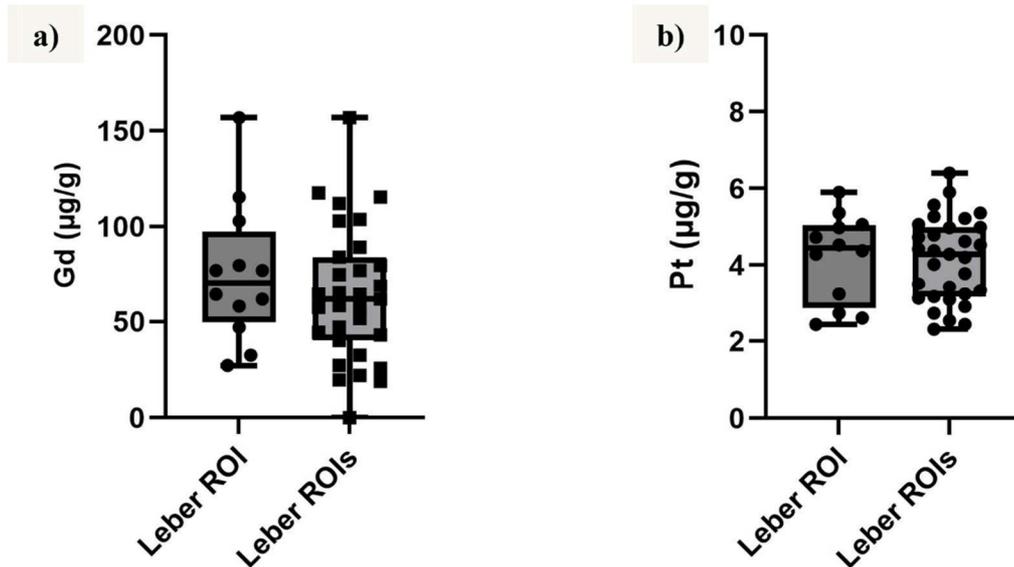
durchschnittlich  $1,89 \pm 2,08 \mu\text{g/g}$ . Demgegenüber zeigt sich bei Einzeichnung der kompletten Tumor-ROI (c, d), dass die höheren Konzentrationen für Pt und Gd der G3 HCCs nicht erfasst werden. Die übrigen Werte für G1 und G2 HCCs sind zwischen mehreren Einzel-ROIs und einer großen Tumor-ROI vergleichbar.



**Abbildung 40:** Gegenüberstellung der Gd- und Pt-Konzentrationen verschiedener kleiner ROIs (a,b) in T1-Tumoren (gruppiert nach Grading) aus Tabelle 10 (zum Zeitpunkt 15 min nach Injektion), sowie einer singulären Gesamtflächen T1-ROI (c,d); dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung

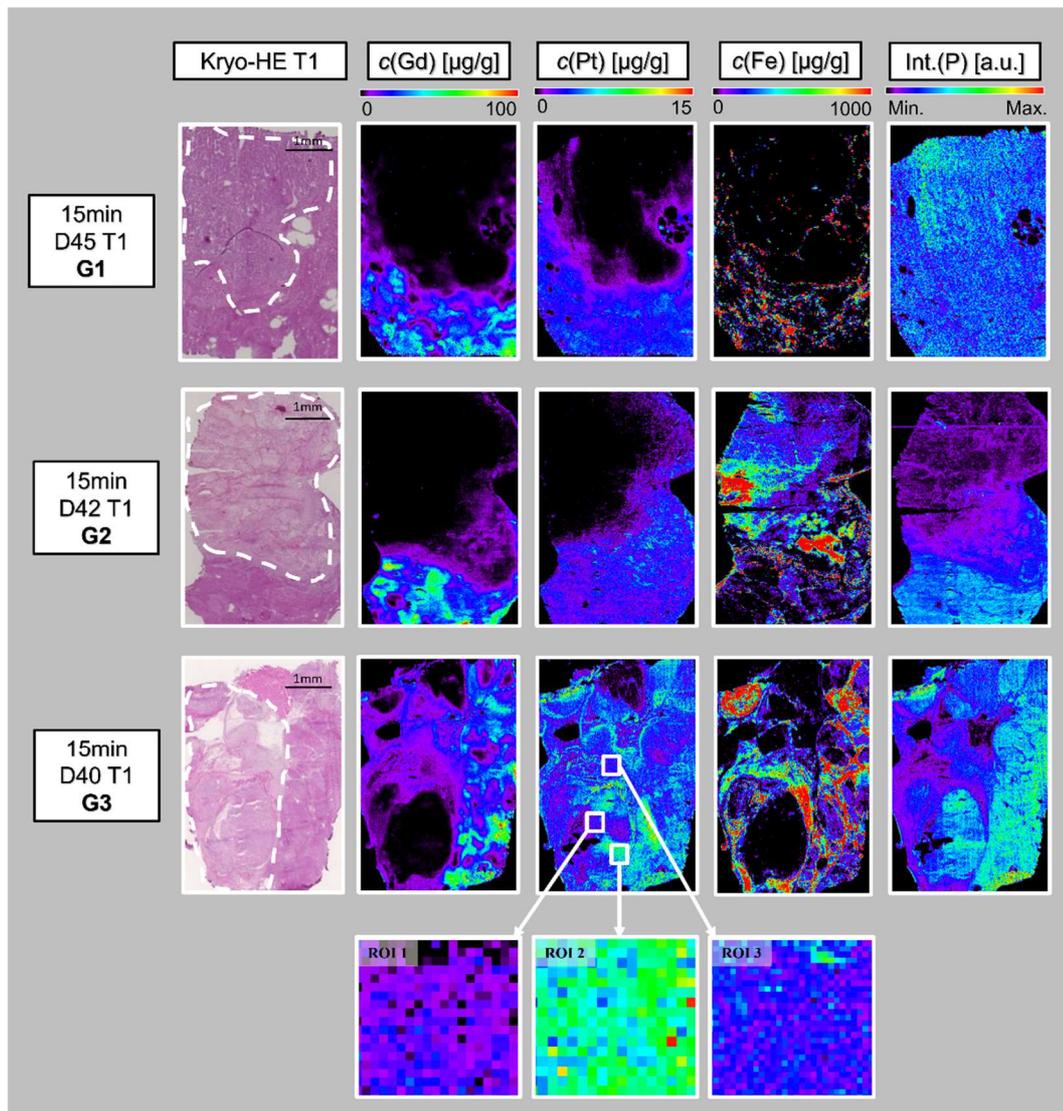
Die Gd-Konzentration der Leber war mit  $64,04 \pm 19,77 \mu\text{g/g}$  signifikant höher als die der T1-Tumore ( $p < 0,0001$ ). Die Leber lag mit einer durchschnittlichen Pt-Konzentration von  $4,13 \pm 1,91 \mu\text{g/g}$  geringgradig unterhalb der G3 und knapp 4-fach oberhalb der G1 und G2 HCCs. Eine Einzeichnung mehrerer ROIs in das Lebergewebe war gegenüber einer einzigen ROI mit keinen neuen Erkenntnissen

verbunden (siehe Abbildung 41 a, b).



**Abbildung 41: Gegenüberstellung der Gd- (a) und Pt-Konzentrationen (b) verschiedener kleiner ROIs im Lebergewebe aus Tabelle 10 (zum Zeitpunkt 15 min nach Injektion), sowie einer singulären Gesamtflächen Leber-ROI; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung**

In Abbildung 42 wird ersichtlich, dass beispielsweise das G3 HCC der Ratte D40 im Gegensatz zur deutlich homogenen Pt-Verteilung in G1 und G2 Tumoren unterschiedlich hohe Pt-Konzentrationen innerhalb des Tumors aufweist (siehe Abbildung 42 ROI 1-3).



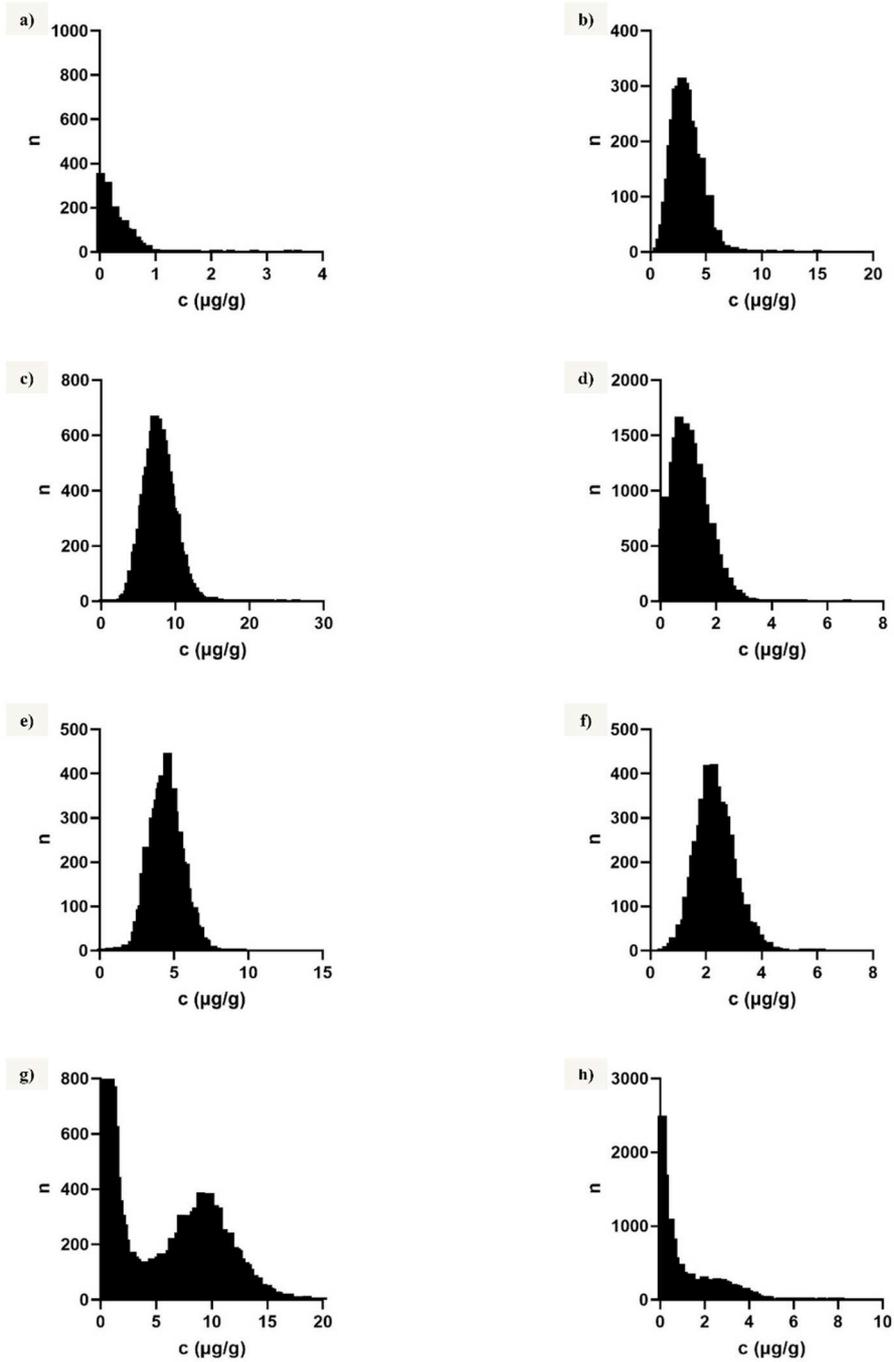
**Abbildung 42: Gegenüberstellung eines G1 (oben), G2 (mittig) und G3 (unten) HCCs (von links nach rechts: Kryo-HE (Skala 1 mm), LA-ICP-MS Gd, Pt, Fe und P mit Darstellung der geringgradigen (lila/dunkelblau) bis hochgradigen (hellgrün bis vereinzelt gelb/orange/rot) Pt-Anreicherung im Tumor (weiß gestrichelte Linie) und zum Teil angrenzenden Lebergewebe zum Entnahmezeitpunkt nach 15 min sowie exemplarischer Einzeichnung dreier Tumor-ROIs (ROI 1-3) mit unterschiedlichen Pt-Konzentrationen im G3 HCC**

Sind in größtenteils hellgrünen Bereichen (ROI 2) hohe Pt-Konzentrationen mit  $6,71 \pm 1,79 \mu\text{g/g}$  messbar, so finden sich in überwiegend lila (ROI 1) und dunkelblauen (ROI 3) Bereichen lediglich  $1,98 \pm 0,96 \mu\text{g/g}$  bis  $2,91 \pm 1,05 \mu\text{g/g}$ . Dieses Ergebnis zeigt im Vergleich zur gemittelten Messung über den kompletten Tumor, dass es intratumoral hohe Unterschiede in der Cisplatin Aufnahme gibt.

#### **2.2.4. Histogrammdarstellung der unterschiedlichen Pt-Konzentrationen c ( $\mu\text{g/g}$ ) im Tumorgewebe von T1-Tumoren und Lebern nach dem Entnahmezeitpunkt von 15 min**

Die Histogrammanalysen von Tumor- und Lebergeweben ergaben folgende Verteilungen (siehe Abbildung 43): G1 (a) und G2 (b) Tumore wiesen mit 66 % gegenüber den G3 Tumoren überwiegend eine rechtsschiefe Verteilung auf. G3 Tumore wiesen c) rechtsschiefe (47 %), d) symmetrische (47 %) und g) bimodale (6 %) Verteilungen auf. Im Lebergewebe überwiegt mit 90 % eine symmetrische (e, f) gegenüber der rechtsschiefen Verteilung mit 10 %.

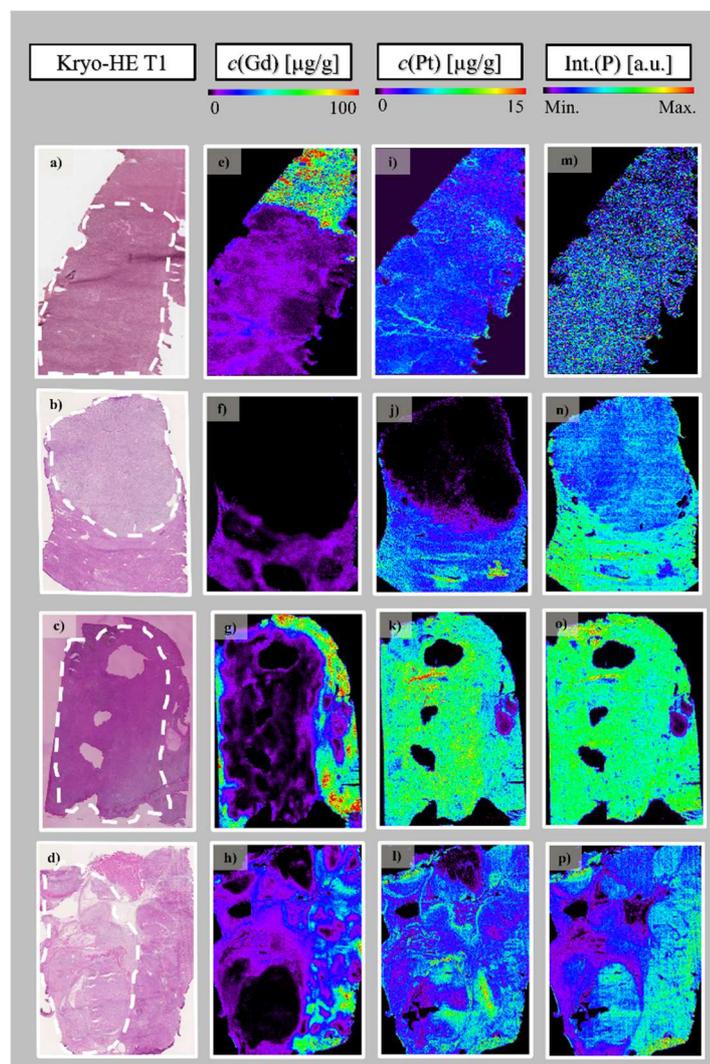
Dieses Ergebnis veranschaulicht neben den LA-ICP-MS-Grafiken, dass intratumoral unterschiedliche Bereiche existieren, die mehr oder weniger Cisplatin aufnehmen können als andere.



**Abbildung 43: Histogramme ausgewählter T1-Tumore und Lebern zur Darstellung der Cisplatin-Verteilung; n = Anzahl der Pixel, c = Konzentration Pt in  $\mu\text{g/g}$ : a) G1 HCC (15 min) und b) G2 HCC (15 min) mit rechtsschiefer Verteilung, c) G3 HCC (15 min) mit symmetrischer und d) (15 min) rechtsschiefer Verteilung, e) und f) Lebern (15 min) mit symmetrischer Verteilung, g) G3 HCC (30 min) mit bimodaler Verteilung, h) G3 HCC (15 min) mit niedriger, rechtsschiefer Verteilung**

### 2.2.5. Qualitative P-Messung

Die Phosphoranalyse ergab hauptsächlich eine homogene P-Verteilung, wobei je nach Zelldichte, Vorhandensein von Schnittartefakten, Nekrosebereichen, zystischen Einschlüssen sowie Bereichen vermehrten interstitiellen Bindegewebes, des sog. Stromas, auch eine heterogene Verteilung unterschiedlich stark vertreten war. Von den 21 untersuchten T1-Tumoren wiesen 81 % eine homogene (siehe Abbildung 44 m-o) und 19 % eine heterogene P-Verteilung (siehe Abbildung 44 p) auf.

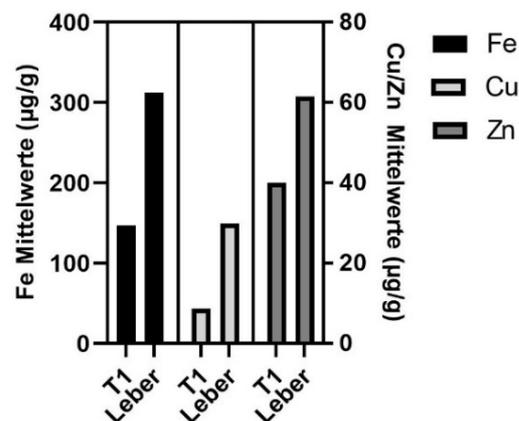


**Abbildung 44:** ausgewählte T1-Tumore (weiß gestrichelte Linie) mit Kryo-HE (a-d), Gd- (e-h), Pt- (i-l) und P- (m-p) Konzentrationen; Demonstration der m) geringgradigen, n) mittelgradigen und o) hochgradigen homogenen sowie p) heterogenen P-Verteilungen

Zusätzlich zu den quantitativen Elementmessungen für Gd, Pt, Fe, Cu und Zn erwies sich die qualitative Phosphormessung als valider Marker zur Darstellung der Gewebestruktur des ablatierten Materials.

### 2.2.6. Quantitative Fe-, Cu- und Zinkmessungen

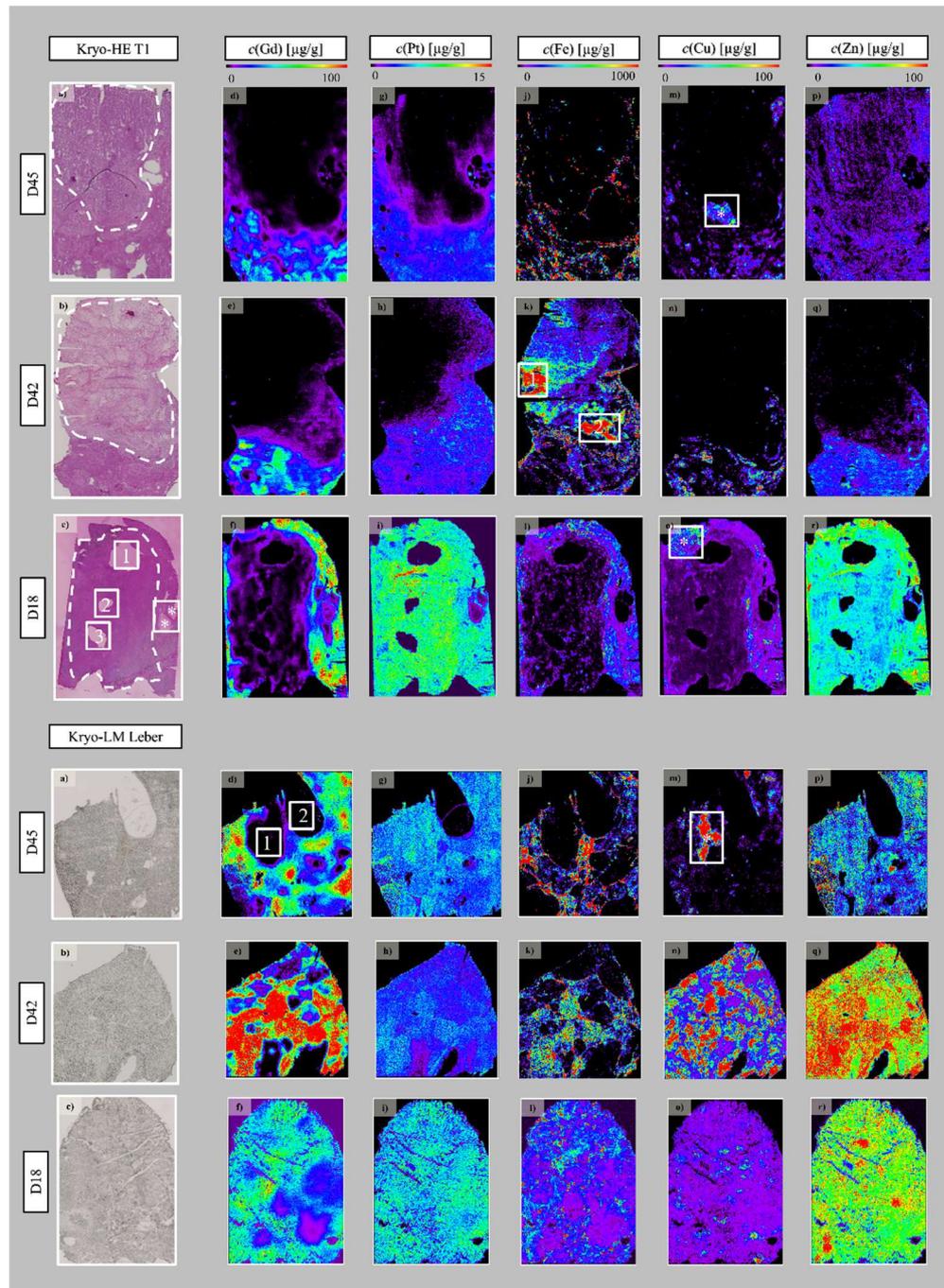
Fe enthielten die Tumore mit durchschnittlich  $147,27 \pm 233,64 \mu\text{g/g}$ , was weniger als der Hälfte der Leberkonzentrationen mit  $321,24 \pm 480,82 \mu\text{g/g}$  entsprach. Bereiche mit Einblutungen wiesen die höchsten Fe-Konzentrationen auf und erreichten vereinzelt Werte von über  $5000 \mu\text{g/g}$ . Neben Fe wurde Cu als essenzielles Spurenelement analysiert. In Tumoren lag dessen Konzentration durchschnittlich bei  $8,73 \pm 7,93 \mu\text{g/g}$ , in Lebern bei  $29,96 \pm 28,94 \mu\text{g/g}$ . In einzelnen Bereichen, sowohl in Tumor- als auch in Leberproben, konnten erhöhte Kupferakkumulationen, welche möglicherweise auf die inadäquate Ausscheidungskapazität der geschädigten Hepatozyten zurückzuführen sind, detektiert werden. Die Zinkverteilung war größtenteils homogen und betrug in Tumoren  $40,07 \pm 15,32 \mu\text{g/g}$ , in Lebern  $61,50 \pm 17,29 \mu\text{g/g}$  (siehe Abbildung 45).



**Abbildung 45: Gegenüberstellung der ermittelten Fe-, Cu- und Zn-Mittelwerte ( $\mu\text{g/g}$ ) von T1-Tumoren und Lebergewebe**

In Abbildung 46 finden sich exemplarisch ausgewählte Tumor-(a-c) und Leberproben (d-f), um die neben Gd und Pt gemessenen Elementkonzentrationen von Fe, Cu und Zn graphisch darzustellen. Es folgt die detaillierte Erläuterung der dort dargestellten Elementakkumulationen sowie die vergleichende

pathohistologische Untersuchung.



**Abbildung 46: T1-Tumore (weiß gestrichelte Linie) der Ratten D45, D42 und D18 (oben) mit Kryo-HE (a-c), Gd- (d-f), Pt- (g-i) Fe- (j-l), Cu- (m-o) und Zn- (p-r) Konzentrationen sowie Leberproben der Ratten D45, D42 und D18 (unten) mit Kryo-lichtmikroskopischer (LM)- Abbildung (a-c), Gd- (d-f), Pt- (g-i) Fe- (j-l), Cu- (m-o) und Zn- (p-r) Konzentrationen zur Demonstration der unterschiedlichen Elementverteilungen; Erläuterungen zu weiteren Markierungen (1, 2, \*) siehe Fließtext**

Der T1-Tumor der Ratte D45 war ein G1 HCC (Entnahmezeitpunkt 15 min) mit vorwiegend solider Architektur und teilweise breit-trabekulären Anteilen. Die Tumorzellen wiesen, wie zu erwarten, ebenso wie diejenigen der Ratte D42 und D18 keine Gd-Aufnahme auf. Die Pt-Aufnahme war im Vergleich zum T1-Tumor der Ratte D18 deutlich reduziert. Dies könnte unter Umständen mit dem Fibrosegrad der Hintergrundleber zusammenhängen. In der Fe-Messung (j) stellte sich die Hintergrundleber wie von einem faserartig durchzogenem Bindegewebsnetz, in dem die Gefäße verliefen, dar. Durch diese bindegewebige Gewebsveränderungen könnte die Pt-Verteilung und Akkumulation im Tumorgewebe womöglich eingeschränkt werden. Die Cu-Verteilung (m) war bis auf kleinere Randbereiche (\*) mit breit-trabekulären Anteilen gering. Die Zn-Verteilung (p) war über den gesamten Tumor geringgradig homogen. Die Leber der Ratte D45 wies zwei rundliche Bereiche im oberen Präparatbereich (1, 2) auf, die kein Gd (d) enthielten. Der rechte dieser beiden Bereiche (2) stellte hierbei ein Schnittartefakt dar. Beim linken (1) handelte es sich um einen FCA, in dem sich eine deutliche Pt-Anreicherung (g) erkennen ließ. Cu (m) akkumulierte hier ebenso hochgradig (\*). Dies könnte einen Hinweis für eine beginnende Malignität dieser Zellen darstellen. Ebenso wie im an den Tumor angrenzenden Hintergrundleberbereich zeigte sich bei der Fe-Messung (j) der Leber von D45 ein faserartiges Netzwerk, das von Blutgefäßen durchzogen wurde. Die Zn-Akkumulation (p) im Lebergewebe war mittelgradig homogen.

Bei T1 der Ratte D42 (Entnahmezeitpunkt 15 min) handelte es sich um ein G2 HCC, das eine vorwiegend solide Architektur aufwies. Seine Tumorzellen reicherten etwas mehr Pt (h) an als das Tumorgewebe von D45 (g), aber deutlich weniger als das von D18 (i). Die Hintergrundleber von D42 (k) wies ebenso wie D45 (j) eine mittelgradige Fibrose auf. Im Tumor selbst waren zwei größere Bereiche mit einem höheren Fe-Signal (1, 2) detektierbar. Hierbei handelte es sich um Einblutungen. Cu (n) und Zn (q) waren nur geringgradig vorhanden. Die Leber von D42 wies eine sehr heterogene Elementverteilung auf. Neben der hochgradigen Gd-Akkumulation (e) waren eine hochgradige Cu-(n) und Zn-(q) Anreicherung auffällig. Fe (k) war insbesondere im mittleren Abschnitt der Probe mittel- bis hochgradig vorhanden.

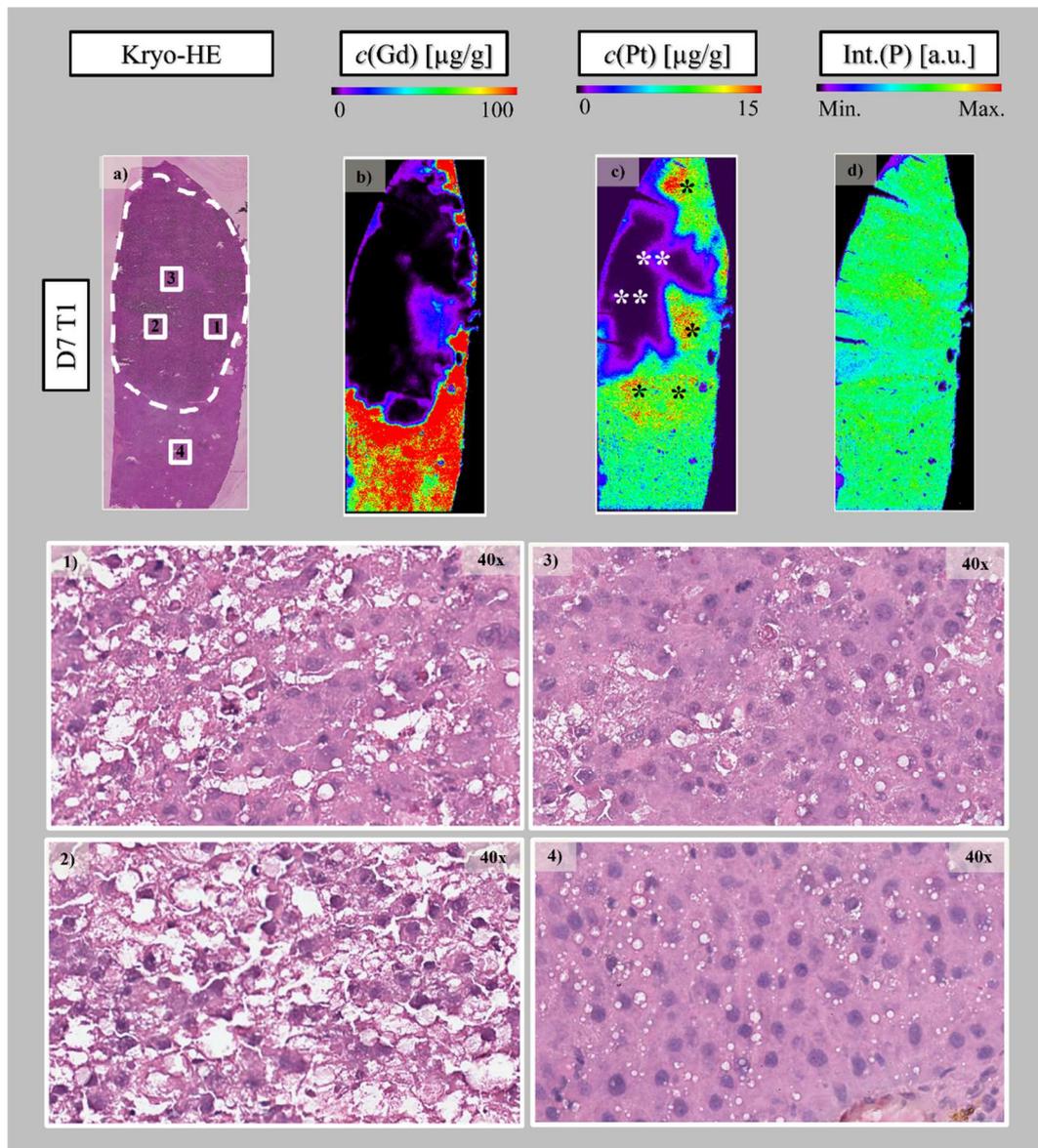
T1 von D18 (Entnahmezeitpunkt 15 min) stellte ein G3 HCC mit trabekulären und soliden Anteilen dar, das teilweise kleine nekrotische Bereiche enthielt. Neben

ausgiebigen Gallengangshyperplasien fanden sich zystische Bereiche (\*) rechts im Bild, die keinerlei Elementanreicherungen enthielten. Bei den drei Bereichen innerhalb des Tumors, die in allen Messungen keine Anreicherungen aufzuweisen hatten, handelte es sich um Artefakte (1-3). Auffällig war die überdurchschnittliche Anreicherung von Pt im Tumorgewebe von D18 (i). Auch die Zn-Konzentration (r) war im Vergleich zu den beiden anderen Proben deutlich erhöht. Die Fibrose der Hintergrundleber wurde als gering bis mittelgradig eingestuft. Cu fand sich erhöht im angrenzenden Lebergewebe sowie in einem kleineren Bereich oben links (\*), in dem mikroskopisch fibrotische Bereiche und hyperplastische Gallengänge detektiert wurden. Die Leber von D18 wies analog zum angrenzenden Lebergewebe der Tumorprobe hohe Gd- (f), Pt- (i) und Zn- (r) Konzentrationen, mittelgradige Fe- (l) und geringgradige Cu- (n) Konzentrationen auf.

#### **2.2.7. Detaillierte Auswertung der Kryo-HE von ausgewählten T1-Tumoren und Lebern mit auffälligen Pt-Verteilungen**

T1 von D7 (Abbildung 47 a) (Entnahmezeitpunkt 30 min) stellte ein G3 HCC dar, das in bestimmten Bereichen (\*) eine auffällig hohe Pt-Konzentration ( $10,4 \pm 2,95 \mu\text{g/g}$ ) innerhalb des Tumors und in dessen Randbereichen aufzuweisen hatte. Demgegenüber standen Bereiche (\*\*), die fast gar keine Pt-Akkumulation ( $0,99 \pm 1,17 \mu\text{g/g}$ ) zeigten (siehe Abbildung 47 c). Pathohistologisch handelte es sich um ein hochgradig heterogenes HCC mit soliden Anteilen (3) sowie Arealen vermehrter Lipomatose mit Zelluntergängen und degenerativer Verfettung (1, 2). Die angrenzende Leber (4) zeigte vergleichbar hohe Pt-Konzentrationen wie der Randbereich des Tumors.

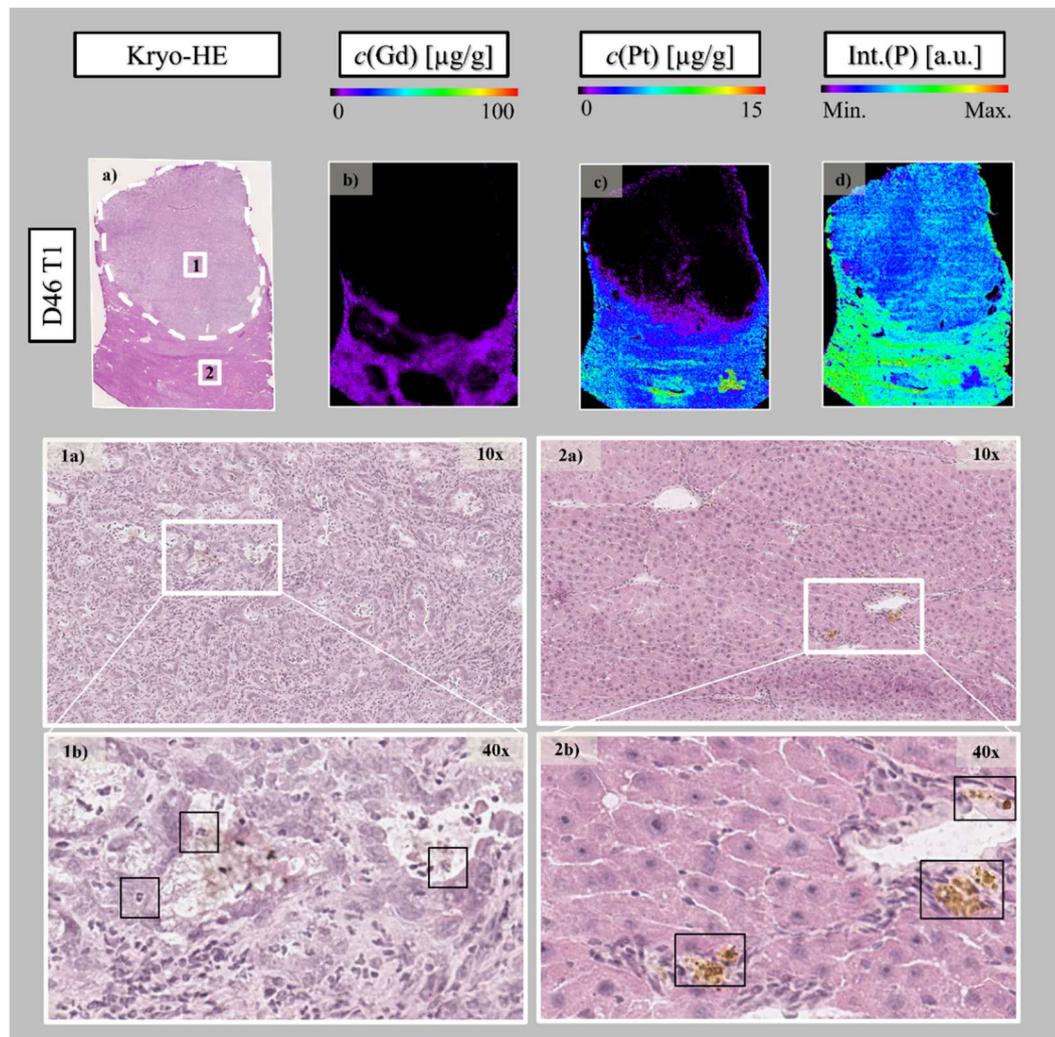
Das Histogramm von D7 T1 zeigte eine bimodale Verteilung (siehe Abbildung 43 g).



**Abbildung 47: D7 T1 (weiß gestrichelte Linie) mit Kryo-HE (a), Gd- (b), Pt- (c) und P- (d) LA-ICP-MS sowie vergrößerten Ausschnitten der Kryo-HE (1-4) in Bereichen mit unterschiedlichen Pt-Akkumulationen (1-3) und angrenzender Leber (4) bei 40x-Vergrößerung; weiße Doppelsternchen: ggr. Pt-Akkumulation, schwarze Sternchen: mgr.-hgr. Pt-Akkumulation**

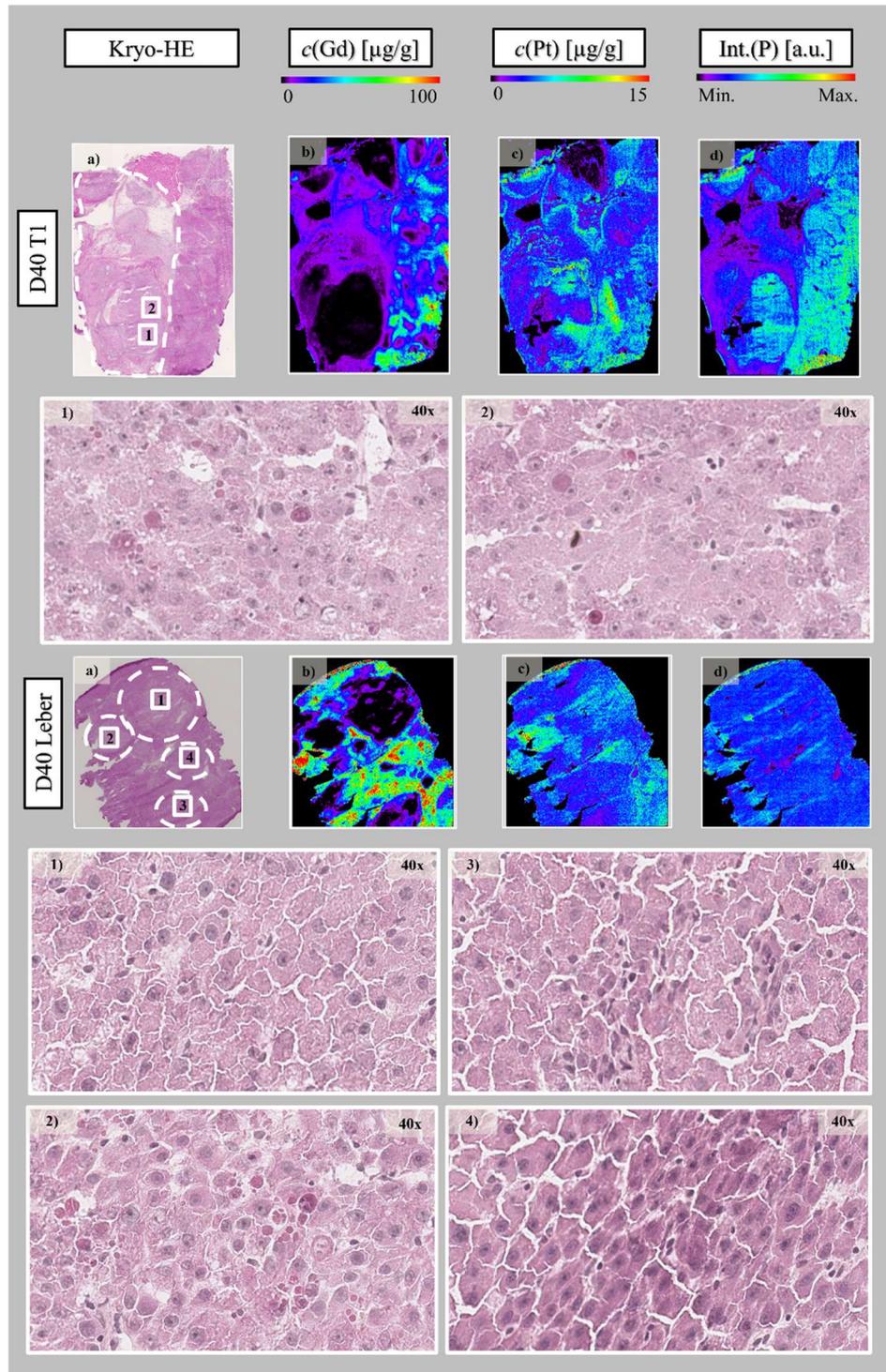
Ein anderes G3 HCC (D46, Entnahmezeitpunkt 15 min) zeigte hingegen eine sehr niedrige Pt-Konzentration im gesamten Tumorbereich (Histogramm siehe Abbildung 43 h). Pathohistologisch bestand der Verdacht für das Vorliegen einer cholangio-hepatozellären Mischform. Der Tumor zeigte ein auffälliges glanduläres Wachstumsmuster (siehe Abbildung 48 1b) und es waren viele neutrophile Granulozyten (siehe Abbildung 48 schwarze Kästen in 1b) zwischen den

Tumorzellen vorzufinden. In der Leber waren multiple Hämosiderineinlagerungen (siehe Abbildung 48 schwarze Kästen in 2b) erkennbar.



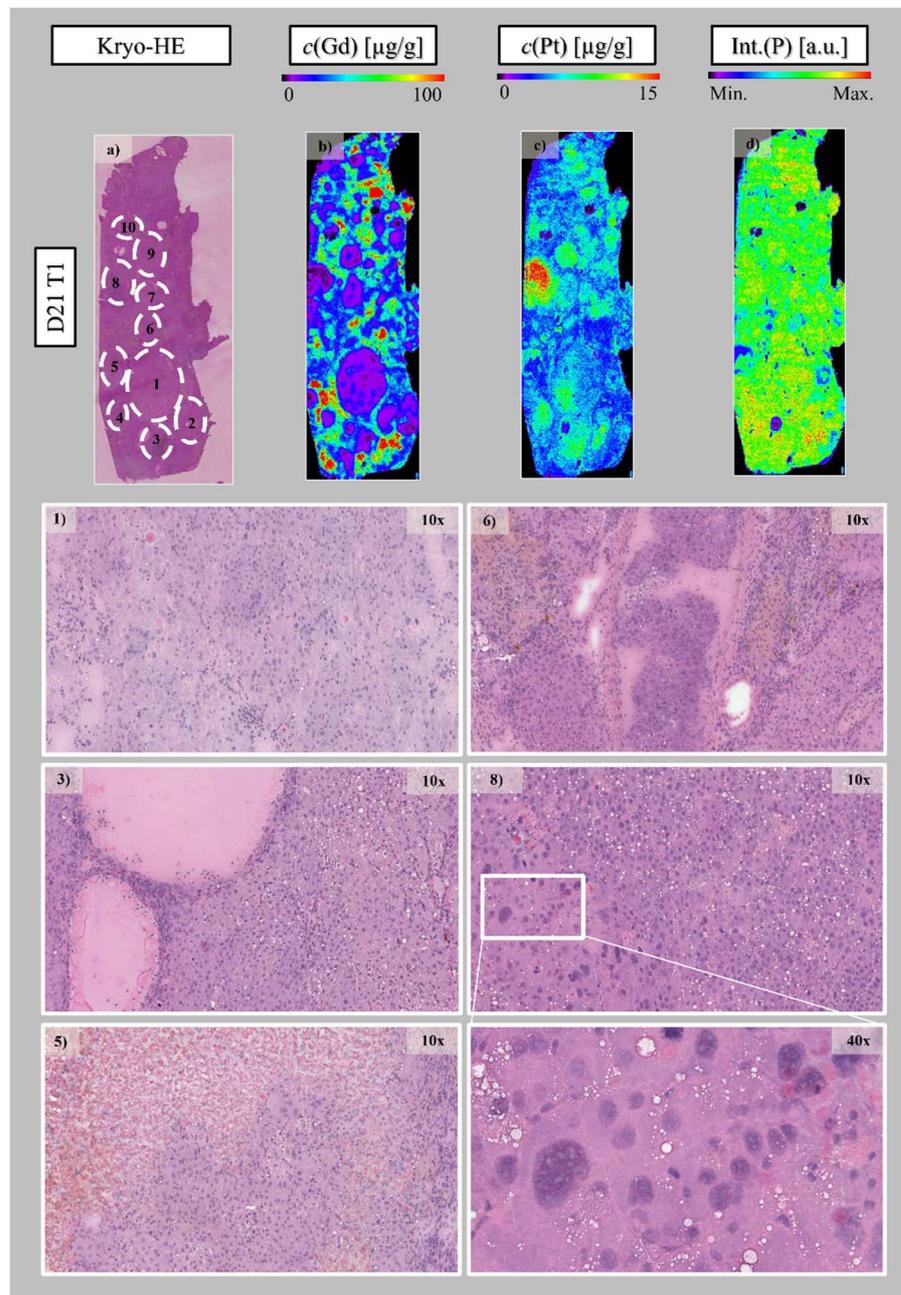
**Abbildung 48: D46 T1 (weiß gestrichelte Linie) mit Kryo-HE (a), Gd- (b), Pt- (c) und P- (d) LA-ICP-MS sowie vergrößerten Ausschnitten der Kryo-HE aus dem Tumorbereich (1) und angrenzender Leber (2) bei 10x- (1a, 2a) und 40x-Vergrößerung inkl. exemplarisch markierter neutrophiler Granulozyten (1b) und Hämosiderineinlagerungen (2b) in schwarzen Kästen**

In Abbildung 49 sind das angrenzende Leberparenchym und T1 von D40 (Entnahmezeitpunkt 15 min), der ebenso pathohistologisch als G3 HCC klassifiziert wurde, dargestellt. Dieses HCC zeigte, ähnlich wie T1 von D7 (siehe Abbildung 47 c) sehr hohe Pt-Anreicherungen ( $7,95 \pm 1,71 \mu\text{g/g}$ ) in bestimmten Tumorbereichen (1), in anderen wies es wiederum (2) nur sehr niedrige ( $1,65 \pm 0,77 \mu\text{g/g}$ ) Pt-Akkumulationen auf. Für diese unterschiedlichen Anreicherungen waren pathohistologisch keine morphologischen Ursachen detektierbar. Die Leber von D40 wies in mehreren rundlichen Bereichen (1-3) eine dem T1 äquivalente Erscheinung mit vereinzelt erhöhter Pt- bei generell erniedrigter bis fehlender Gd-Akkumulation auf. Die pathohistologische Untersuchung bestätigte für diese Bereiche das Vorliegen kleinerer G3 HCCs (1, 2) sowie eines FCAs (3). Die G3 HCCs enthielten Pt dabei heterogen (1 = vermindert, 2 = vermehrt), beim FCA war eine dem umgebenen Lebergewebe entsprechende, homogene Pt-Konzentration und eine verminderte bis keine Gd-Akkumulation nachweisbar. Die Bereiche der Leber, die hingegen noch funktionsfähige Hepatozyten zu enthalten scheinen, zeigten eine deutliche Gd-Akkumulation (4).



**Abbildung 49: D40 T1 und Leber mit Kryo-HE (a), Gd- (b), Pt- (c) und P- (d) LA-ICP-MS sowie vergrößerten Ausschnitten der Kryo-HE aus dem Tumorbereich ohne morphologische Unterschiede in Bereichen mit vermehrter (1) bzw. verminderter (2) Pt-Akkumulation; Leberprobe (1-4) mit G3 HCCs mit verminderter (1) und vermehrter (2) Pt-Akkumulation sowie einem FCA (3) ohne und Lebergewebe (4) mit erhöhter Gd-Akkumulation bei 40x-Vergrößerung**

Einen sehr heterogenen Tumor stellte T1 von D21 (Entnahmezeitpunkt 15 min) dar (siehe Abbildung 50).



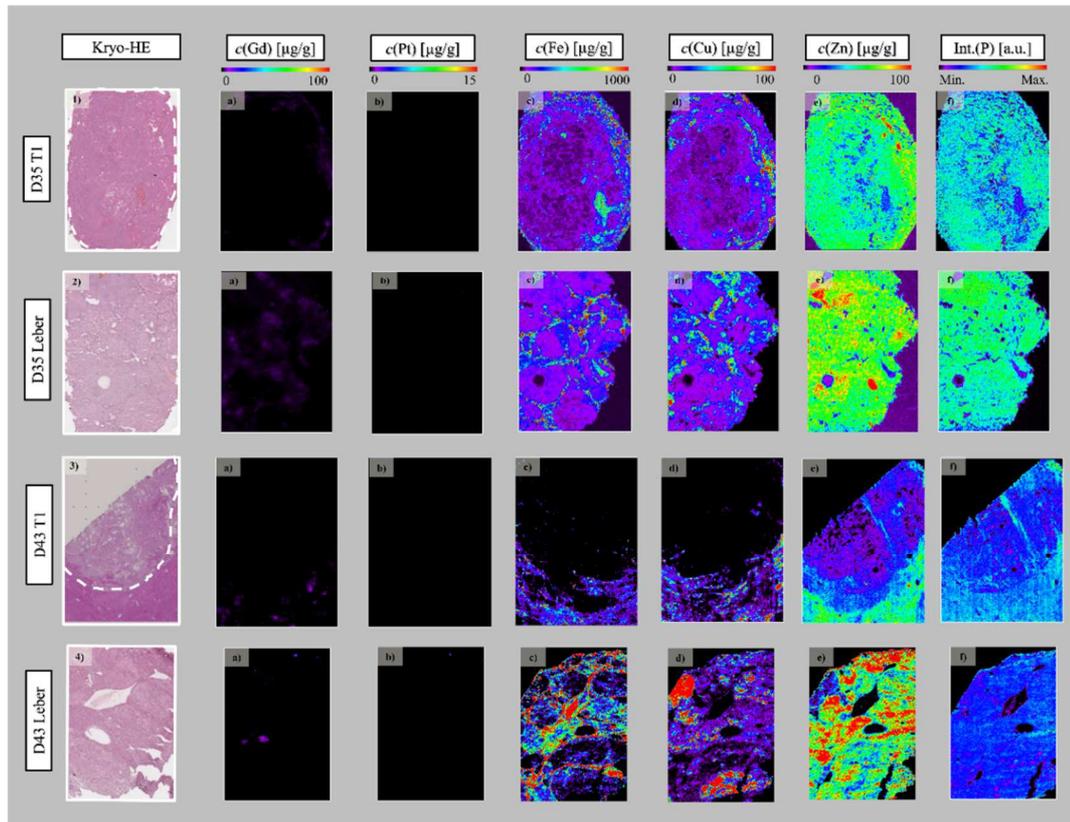
**Abbildung 50: D21 T1 mit Kryo-HE (a), Gd- (b)-, Pt- (c) und P- (d) LA-ICP-MS sowie vergrößerten Ausschnitten der Kryo-HE aus dem Tumorbereich mit 10 eingezeichneten ROIs (weiß gestrichelte Kreise) sowie exemplarischen Ausschnitten: (1) homogenes Grad 3 HCC, (3) Grad 3 HCC mit zystischer Dilatation, (5) Grad 3 HCC mit Nekrosen (rötlich), (6) Grad 3 HCC mit Gefäßeinbruch, (8) Grad 3 HCC mit erhöhter Anzahl atypischer Mitosen, Riesenzellen sowie erhöhter Basophilie**

Pathohistologisch waren alle Tumorbereiche (siehe Abbildung 50 ROI 1-10) einem G3 HCC zuzuordnen. Insgesamt wurden 10 ROIs genauer analysiert (a) mit folgenden pathohistologischen Befunden: ROI 1, 2, 7 und 9 zeigten homogene G3 HCCs. In ROI 3, 4 und 10 fanden sich G3 HCCs mit zystischen Bereichen, vermehrten Glykogeneinlagerungen und Steatosen. ROI 5 wies eine ausgiebige Nekrose und ROI 6 Gefäßeinbrüche auf. ROI 8 stellte einen G3-HCC-Bereich dar, der überdurchschnittlich viel Pt ( $13,39 \pm 3,03 \mu\text{g/g}$ ) gegenüber den übrigen ROIs ( $5,97 \pm 1,79 \mu\text{g/g}$ ) anreicherte. Hier fanden sich vermehrt atypische Mitosen, Riesenzellen und dysplastische Zellen sowie eine erhöhte Basophilie. Pathohistologisch bestand der Verdacht auf das Vorliegen eines stärker vaskularisierteren Bereichs innerhalb des Tumors.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der überwiegende Teil der T1-Tumore, unabhängig vom Entnahmezeitpunkt und Grading sehr wenig Pt aufnahm. Hierbei konnten pathohistologisch immer wieder eine vermehrte Fibrose der Hintergrundleber, zystische und sinusoidale Dilatationen, Nekrosen, Gallengangshyperplasien, Lipomatosen, Steatosen, Glykogeneinlagerungen und ein erhöhter Gehalt an Entzündungszellen wie neutrophiler Granulozyten beobachtet werden. Diese Veränderungen konnten allerdings ebenso in Tumoren mit höheren Pt-Konzentrationen detektiert werden.

#### **2.2.8. Kontrolltiere ohne Pt-Injektion**

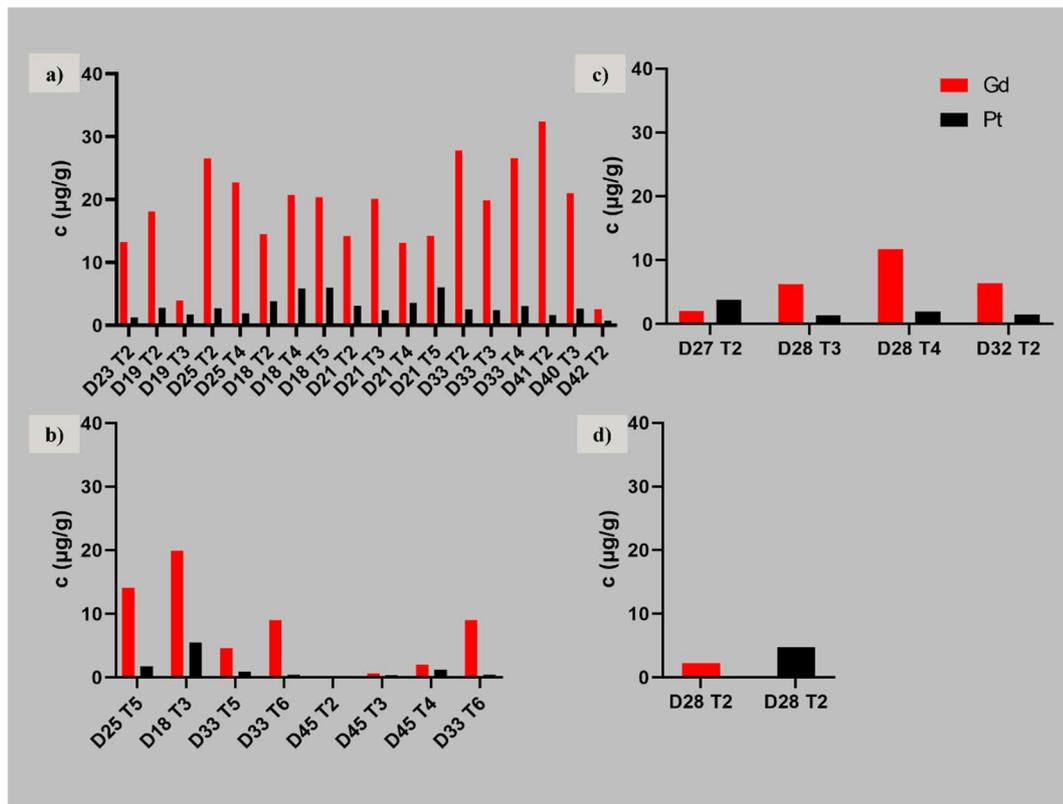
Da den Kontrolltieren ( $n = 5$ ) am Tag vor der Angiographie während des DCE-MRTs das Gd-haltige Kontrastmittel Primovist® verabreicht wurde, waren teilweise noch geringgradige Gd-Konzentrationen im Leberparenchym sowie am angrenzenden Lebergewebe von T1 nachweisbar (siehe Abbildung 51, 1-4 a). Cisplatin wurde nicht injiziert, weshalb Pt (siehe Abbildung 51, 1-4 b) in der LA-ICP-MS nicht nachgewiesen werden konnte. Werte für Fe, Cu, Zn und P wurden ebenso ermittelt.



**Abbildung 51: T1- und Leberproben der Kontrolltiere D35 und D43 zur Darstellung der Elementverteilungen: 1-4 Kryo-HE von T1 (weiß gestrichelte Linie) und Lebern mit a) Gd, b) Pt, c) Fe, d) Cu, e) Zn und f) P-Verteilung**

### 2.3. Gesamtgehalte der Resttumore T2-T6

Dargestellt sind die Gesamtgehalte (siehe Abbildung 52) von Gd (rot) und Pt (schwarz) von a) allen G3 T2-T6 Tumoren zum Entnahmezeitpunkt von 15 - 20 min, b) allen G1 und G2 T2-T6 Tumoren zum Entnahmezeitpunkt von 15 - 20 min sowie c) allen G3 T2-T6 Tumoren zum Entnahmezeitpunkt von 30 - 60 min und d) einem G1 T2 Tumor zum Entnahmezeitpunkt von 30 min.



**Abbildung 52: Übersicht der Gesamtgehalte der Gd-(rot) und Pt-(schwarz) -Konzentrationen der T2-T6 Tumore gruppiert nach Grading und Entnahmezeitpunkten: a) G3 HCCs nach 15 - 20 min, b) G1 und G2 HCCs nach 15 - 20 min, c) G3 HCCs nach 30 - 60 min und d) G1 HCC nach 30 min**

Auffallend waren die hohen Gd-Konzentrationen in der Gesamtgehaltmessung, da Gd nur von funktionsfähigen Hepatozyten aufgenommen wird. Die Gd-Konzentrationen nahmen mit steigendem Entnahmezeitpunkt ab.

Auch in der LA-ICP-MS (siehe Abbildung 53 h, j, l) war dieser Trend (siehe Abbildung 38) erkennbar.



So zeigte sich nach 15 min ein gelblich-rötliches Gd-Bild (h) mit hohen Konzentrationen, nach 30 min ein türkis-bläuliches (j) und nach 60 min ein dunkelviolettes Gd-Bild (l) mit entsprechend niedrigen Konzentrationen.

Ebenso wie in der ortsaufgelösten LA-ICP-MS wird auch in der Gesamtgehaltmessung für Pt deutlich, dass Tumore desselben Gradings unterschiedlich viel Pt aufnehmen können. Bei den einbezogenen Proben schwanken die Pt-Konzentrationen innerhalb desselben Gradings um einen Faktor von bis zu 6. Der Mittelwert der G3 Tumore zum Entnahmezeitpunkt von 15 - 20 min (a) lag für Gd bei  $18,46 \pm 1,08 \mu\text{g/g}$  und für Pt bei  $3,02 \pm 0,20 \mu\text{g/g}$ . Bei den G1 und G2 HCCs (b) lag er bei gleichem Entnahmezeitpunkt für Gd bei  $7,21 \pm 0,49 \mu\text{g/g}$  und für Pt bei  $1,47 \pm 0,12 \mu\text{g/g}$ . Nach 30 - 60 min lagen die Werte für Gd bei  $6,58 \pm 0,48 \mu\text{g/g}$ , für Pt bei  $2,16 \pm 0,73 \mu\text{g/g}$  bei den G3 HCCs, bei dem einzigen gemessenen G1 HCC nach 30 min bei  $2,24 \pm 0,17 \mu\text{g/g}$  für Gd und  $4,74 \pm 0,42 \mu\text{g/g}$  für Pt.

Die Schwankungen der Pt-Konzentrationen innerhalb von Tumoren desselben Gradings wie auch zwischen unterschiedlichen HCC-Graden fanden sich wie in der ortsaufgelösten LA-ICP-MS, unter Berücksichtigung möglicher Verzerrungen durch angrenzendes Leberrestgewebe, ebenso in der Gesamtgehaltsbestimmung mittels SQ-ICP-MS.

## V. DISKUSSION

### 1. Diskussion der Methodik und Limitationen

Gemäß des 3-R-Prinzips gilt beim Einsatz von Versuchstieren in der Forschung die Tierzahlen auf ein absolutes Mindestmaß zu reduzieren (Díaz *et al.*, 2020). Obwohl dies bei der Versuchsplanung immer berücksichtigt wird, kann es im Zuge der Etablierung neuer Modelle und der Entwicklung und Anwendung neuartiger Methoden zu unvorhersehbaren Komplikationen kommen, die sich trotz akribischer Versuchsplanung nicht vollständig vermeiden lassen. Insbesondere lebende Organismen, denen pathogene Substanzen injiziert oder Tumore implantiert werden, sind biologischen Schwankungen unterworfen, die nur in begrenztem Maße kalkulierbar sind. Im durchgeführten Versuch sind während der Induktionsphase sechs Tiere einer Kohorte verstorben, wobei eine zuchtgenetische Ursache vermutet wurde.

Es gilt darüber hinaus der Grundsatz Tierversuche durch alternative Methoden zu ersetzen und das Tierleid durch Reduktion der Belastung auf ein absolutes Minimum zu beschränken (Russell and Burch, 1960). Um einen möglichst großen prädiktiven Wert der Studie in Bezug auf eine nachfolgende klinische Anwendung zu erzielen, ist es jedoch nötig ein präklinisches Tumormodell zu verwenden, das die humane Pathologie möglichst getreu widerspiegelt (Groß *et al.*, 2015). Die zu untersuchende Akkumulation und Perfusion von Cisplatin und Primovist® ist nur in einem lebenden Organismus mit vorhandenem Stoffwechsel möglich, weshalb ein Tierversuch für diese Studie unumgänglich war.

Trotz akribischer Planung und möglichst exakter Ausführung bezüglich Standardisierung und Reproduzierbarkeit ergaben sich in der Arbeit durch das Zusammenspiel vieler, verschiedener Versuchsabschnitte bzw. Arbeitsschritte gewisse Limitationen. Essenziell für die Durchführung dieser Arbeit war nach erfolgter Tumorinduktion im DEN-induzierten HCC-Modell der Ratte die erfolgreiche Durchführung der Angiographie mit anschließender Tumorentnahme. Die Tumore wurden dann für die LA-ICP-MS weiterverarbeitet und letztendlich folgte die vergleichende Analyse von massenspektrometrischen und pathohistologischen Untersuchungsergebnissen. Folgende Punkte führen zu Limitationen in Standardisierung und Reproduzierbarkeit:

- keine Planbarkeit der Häufigkeit des Auftretens unterschiedlicher Gradings (G3 war übermäßig stark vertreten gegenüber G1 und G2 HCCs) während der Induktion der HCCs
- hoher handwerklicher Anspruch an die Operateure aufgrund der geringen Größe des Versuchstiers Ratte bei angiographischen Interventionen sowie Limitationen durch Materialgrößen (die selektive Katheterisierung der rechten oder linken Leberarterie gelang aufgrund eines für den Katheter zu kleinen Gefäßdurchmessers nicht immer)
- zur Vaskularisationsbeurteilung existiert kein standardisiertes Verfahren
- aufgrund sehr langer LA-ICP-MS-Messzeiten ist nur die Untersuchung eines einzigen Schnittes möglich, was die Beurteilung eines größeren Probenumfangs erschwert

Um beeinflussbare Fehlerquellen auf ein Minimum zu reduzieren, wurden u.a. die folgenden Maßnahmen unternommen:

### **1.1. Tiermodell**

Wie in Kapitel II.7.1.1. erläutert, geht das DEN-induzierte HCC-Modell der Ratte mit einem Entwicklungszyklus der Hepatozytenschädigung (inkl. Zirrhose und Malignität) einher, wie er auch beim menschlichen HCC beobachtet wird. Außerdem konnten bereits mehrere, erfolgreiche Studien zur transarteriellen Chemoembolisation im Ratten-HCC-Modell durchgeführt werden (Vogl *et al.*, 2016; Gade *et al.*, 2017; Quan *et al.*, 2021). Deshalb wurde dieses Modell als geeignet zur Durchführung einer Chemoperfusionsstudie erachtet.

Es wird angenommen, dass Östrogene einen protektiven Effekt bei der Entwicklung des HCCs ausüben, Androgene hingegen die Hepatokarzinogenese stimulieren können (Yang *et al.*, 2012; Tolba *et al.*, 2015). Daher wurden für diese Studie nur männliche Ratten, die zu Beginn der Studie ein Alter von acht Wochen hatten, verwendet. Das Alter der Tiere wurde so gewählt, dass sie nach achtwöchiger Induktions- und anschließender zweiwöchiger Auswaschphase eine ausreichende Größe für die MR-Bildgebung sowie die Angiographie hatten.

Bereits in einer früheren Studie zeigte sich, dass im DEN-induzierten HCC-Modell der Ratte vorwiegend G2 und G3 HCCs, weniger G1 HCCs generiert werden konnten (Groß *et al.*, 2015). Dies stellt eine Herausforderung für eine Grading-basierte Auswertung dar und bedarf weiterer Lösungsansätze für zukünftige

Studien, um die Tierzahlen weiter zu reduzieren. Da sich beim ebenso häufig eingesetzten, orthotopen HCC-Modell mit *in vitro* gezüchteten Zellen die Tumore innerhalb einer gesunden Hintergrundleber entwickeln, wurde das DENA-induzierte HCC-Modell, mit einhergehender Fibrose und Zirrhose des Leberhintergrunds, als geeignetere Methode erachtet (Santos, Colaço and Oliveira, 2017).

## **1.2. MR-Bildgebung**

Die Durchführung der Bildgebung wurde stets von denselben Personen und nach derselben Methodik durchgeführt. Dadurch wurde gewährleistet, dass die verwendeten Substanzen immer in gleicher Menge und nach dem gleichen Prinzip unter Standardbedingungen (Narkosedauer, Atemfrequenzüberwachung mittels Atemkissen, kontinuierliche Isoflurannarkose, kontinuierlicher Warmluftstrom), injiziert wurden. Für die Perfusionsbildgebung wurde Primovist® zeitlich standardisiert nach dem Start der DCE-Sequenz pumpengesteuert intravenös injiziert. Hierbei konnte das arterielle Hyperenhancement mit dem darauffolgenden Wash-out der zu untersuchenden HCCs beobachtet werden (Kim, Joo and Lee, 2019). Dies erlaubte häufig die sofortige Aussage über das Vorliegen eines HCCs alleinig mittels der Bildgebung, wie es auch im Zuge der Diagnostik des humanen HCCs Anwendung findet (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

## **1.3. Angiographie**

Ebenso wie die MR-Bildgebung wurde die Angiographie stets von denselben Personen unter Standardbedingungen (Reflexkontrolle zur Überprüfung der Narkosetiefe und bei Bedarf Nachdosierung der Narkotika, Atemfrequenzkontrolle, Körpertemperaturkontrolle, Injektion der verwendeten Substanzen Primovist® und Cisplatin von derselben Person) und nach derselben Methodik durchgeführt. Aufgrund von unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten der Tumore nach erfolgter DSA variiert die Gewebepfusion zwischen den verschiedenen Gruppen (10, 15 - 20, 30 und 60 min). Daher erwies sich lediglich der Vergleich der Tumore innerhalb einer Entnahmezeitpunktgruppe als sinnvoll und minimierte so den analysierbaren Probenumfang deutlich. Ein Embolisat wird bei der standardmäßigen TACE beim Menschen verwendet, um möglichst hohe intratumorale Zytostatikakonzentrationen zu erzielen (Vogl *et al.*, 2007). Da die Etablierung der Methodik sowie die Untersuchung der Chemoperfusion in der

durchgeführten Orientierungsstudie im Vordergrund standen, wurde kein Embolisat verwendet. Dies könnte sich auf die intratumoralen Chemotherapeutikakonzentrationen ausgewirkt haben und sollte in künftigen Studien berücksichtigt werden.

#### **1.4. Pathohistologie**

Für das Grading und die pathohistologische Auswertung wurde mit der HE-Färbung eine Standardfärbung, zur Beurteilung der Tumervaskularisation die immunhistochemische Färbung mit CD31-Antikörpern verwendet. Bei letzterer wird die Gefäßdichte als Zeichen einer gesteigerten Angiogenese im Tumor mittels CD31-Positivität aufgezeigt (Chen *et al.*, 2013). Zur Untersuchung der Tumervaskularisation existiert keine Standardmethode, weshalb auf die Kombination aus computergestützter Software und manueller Auswahl an ROIs zurückgegriffen wurde. Dies wurde derartig in vergleichbaren Studien bereits angewandt (Nolff *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2021). Die bereits unter II.5.2.3 diskutierten Möglichkeiten zur Ermittlung der MVD bspw. mittels der Weidner- oder Chalkley-Methode waren aufgrund ihres erhöhten Materialaufwandes (spezieller Mikroskopaufsatz) und einer nicht-digitalen Objektträgerverarbeitung unpraktikabel (Zhang, Wu, *et al.*, 2020). Der in dieser Arbeit angewandte Fibrosegrad nach Desmet und Scheuer wird in der Praxis lediglich an speziellen Bindegewebsfärbungen und mit ggf. nachfolgender Versilberung durchgeführt (Schirmacher, Fleig and Dienes, 2004; Pornwilard *et al.*, 2013). Daher stellt die Kombination aus Beurteilung von Kryo-HE-Material mit der semiquantitativen Auswertung der Fe-LA-ICP-MS eine neue Methode dar, die Nachuntersuchungen auf ihre Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit bedarf.

#### **1.5. LA-ICP-MS und SQ-ICP-MS**

Die LA-ICP-MS hat sich in den letzten Jahren zur Methode der Wahl für die Darstellung von Elementen in dünnen Gewebeschnitten entwickelt (Becker *et al.*, 2010). Sie wurde bereits als Bildgebungsinstrument für metallbasierte Chemotherapeutika in präklinischen Studien verwendet, um deren Konzentrationen in Tumorproben genauer zu untersuchen. Dabei vereint sie die Vorteile einer schnellen Probenvorbereitung mit der orts aufgelösten Visualisierung von Elementverteilungen und der Quantifizierung unterhalb des  $\mu\text{g}$ -Bereichs (Theiner *et al.*,

2018). Deshalb wurde die LA-ICP-MS in der hier durchgeführten platinbasierten Chemoperfusionsstudie als geeignete Methode zur Beurteilung der Elementverteilungen erachtet. Nachteilig erwiesen sich lange Messzeiten für einen einzigen Gewebeschnitt, was die Untersuchung eines größeren Probenumfangs einschränkte. Die parallele Beurteilung der Kryo-HE Schnitte verlangte, insbesondere aufgrund einer verminderten morphologischen Qualität der Kryoproben im Vergleich zum Paraffin-HE-Schnitt, ein hohes Maß an Untersucherexpertise. Für die Gesamtgehaltsmessungen mittels SQ-ICP-MS musste in der durchgeführten Studie das angrenzende Leberrestgewebe nachträglich entfernt werden, da es zur Orientierung in den zuvor angefertigten HE- und CD31-Parallelschnitten essenziell war. Eine Präparation sollte aus technischen Gründen in zukünftigen Studien vor der Kryokonservierung erfolgen, da die nachträgliche Präparation in dieser Arbeit zu falsch hohen Elementkonzentrationen führte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei dem hier etablierten katheterbasierten Tiermodell im DEN-induzierten HCC der Ratte um ein reproduzierbares Modell handelt, das zur weiteren Untersuchung der Chemoperfusion und Tumorheterogenität des HCCs eingesetzt werden kann. In Kombination mit der massenspektrometrischen sowie pathohistologischen Korrelation ermöglicht es eine Beurteilung der Elementverteilung auf zellulärer Ebene.

## **1.6. Limitationen**

Der Einsatz von Modellen ist in der Forschung zur Untersuchung von bestimmten Fragestellungen oftmals unumgänglich. Deshalb wurden für die durchgeführte Studie die am besten geeigneten Methoden ausgewählt und kombiniert, um ein katheter-basiertes *in vivo*-Tiermodell im DEN-induzierten HCC der Ratte zur Untersuchung der Tumorheterogenität und Tumorperfusion zu etablieren. Zwangsläufig ergeben sich bei der Verwendung von Modellen immer auch Limitationen, auf die abschließend nochmals kurz eingegangen werden soll.

Durch die *in vivo*-Induktion im DEN-induzierten HCC-Modell der Ratte entstehen zwar durch ähnliche pathologische Vorgänge wie beim Menschen HCCs, jedoch entstehen diese, da es sich um ein zeitlich begrenztes Modell handelt, in viel kürzerem Zeitrahmen und aus anderer Ätiologie heraus, als dies bei der natürlichen Hepatokarzinogenese geschieht. G3 HCCs wurden durch dieses Modell im

Vergleich zu G1 und G2 HCCs überrepräsentativ häufig induziert, was die Korrelationen zwischen verschiedenen Gradings aufgrund einer zu geringen Probenanzahl in bestimmten Graden limitierte. Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der Tumore ausschließlich im Modellorganismus der Ratte. Dieser weist schon wegen seiner Größe eine deutlich höhere Herz- und Atemfrequenz als der Mensch auf, wodurch es zu einem anderen Perfusionsverhalten und damit zu einer Beeinflussung der Kontrastmittel- und Chemotherapeutikaakkumulation kommen kann. Daher sind die daraus resultierenden Ergebnisse nicht zwingend in ihrem kompletten Umfang auf den Menschen übertragbar.

## **2. Diskussion der Ergebnisse**

### **2.1. Pathohistologie**

#### **2.1.1. Grading und Vaskularisation**

Bei der Quantifizierung der Gefäße mittels positivem Pixel Count wiesen G3 Tumore eine signifikant höhere Vaskularisation als das umgebende Lebergewebe und eine höhere als G1 und G2 Tumore auf. Dies deckt sich mit der im Zuge der Hepatokarzinogenese vollzogenen Neoangiogenese, also der fast vollständigen Versorgung des Tumors über unpaare Arterien im fortgeschrittenen Tumorstadium (Matsui *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2018; Rimola, 2020). Bei der hier durchgeführten Untersuchung gilt es, den geringen Probenumfang für G1 und G2 Tumore zu berücksichtigen. Zur Signifikanzuntersuchung zwischen diesen Gradings müssten weitere Untersuchungen mit höheren Probenzahlen vorliegen. Darüber hinaus gilt es zu beachten, dass die Beurteilung der Vaskularisation in der CD31 über PPC kein standardisiertes Verfahren darstellt, da bezüglich der Vaskularisationsauswertung derzeit keine Standardmethode existiert. Die Auswahl der ROIs, die als repräsentativ für die Tumolvaskularisation ausgewählt wurden, sind subjektiv und daher untersucherabhängigen Schwankungen unterworfen. Insbesondere bei der Weiterverarbeitung von stark zirrhosischen Geweben und HCCs in fortgeschrittenen Stadien kommt es immer wieder zu morphologisch-bedingten Schnitt- und/oder Färbeartefakten, die eine Auswertung des Schnittes erschweren oder sogar unmöglich machen.

## 2.2. Ortsaufgelöste Massenspektrometrie der T1-Tumore

### 2.2.1. Korrelation von Fibrosegrad und Gd-Aufnahme

Aufgrund der Tatsache, dass Gd überwiegend von funktionsfähigen Hepatozyten aufgenommen wird, erscheint es nachvollziehbar, dass mit steigendem Fibrosegrad und dadurch weniger vorhandenen, funktionsfähigen Hepatozyten die Gd-Aufnahme sinkt. Da der angewandte Fibrosegrad nach Desmet und Scheuer an Kryo-HEs und LA-ICP-MS-Fe-Messungen keine Standardmethode darstellt, wird sich zeigen müssen, ob diese Ergebnisse Anstöße für nachfolgende Untersuchungen weiterer Elementverteilungen in Bezug auf den Fibrosegrad der Hintergrundleber liefern können.

### 2.2.2. LA-ICP-MS der T1-Tumore

Die unterschiedlichen Entnahmezeitpunkte der LA-ICP-MS T1-Tumore mit den daraus resultierenden, unterschiedlichen Perfusionsverhältnissen basieren auf der Tatsache, dass es sich bei der durchgeführten Studie um eine Orientierungsstudie handelte und zuerst evaluiert werden sollte, zu welchen Entnahmezeitpunkten sich gute Elementkonzentrationen in Tumor- und Lebergewebe nachweisen lassen.

Die Pt-LA-ICP-MS Ergebnisse bestätigten das heterogene Auftreten, welches das HCC auch in der Bildgebung und in der Pathohistologie zeigt. Weder das Grading noch die Entnahmezeitpunkte ließen eine Gruppierung der Tumore zu. Jeder Tumor musste individuell pathohistologisch und massenspektrometrisch betrachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass diverse Mechanismen existieren, die bis dato noch nicht ausreichend erforscht sind, jedoch einen enormen Einfluss auf die Pt-Aufnahme in Tumorgewebe haben könnten. Vorstellbar wäre eine unterschiedliche Aufnahmefähigkeit der Tumorzellen innerhalb der verschiedenen HCC-Subtypen (siehe II.5.1.2), welche sowohl eine breite pathohistologische als auch genetische Vielfalt aufzuweisen haben, wie auch beispielsweise die Beeinflussung der Pt-Aufnahme durch das den Tumor umgebende Mikromilieu.

Diskutiert werden unter anderem die Downregulation bestimmter, am Pt-Transport beteiligter Proteine, wie die des Kupfertransporters 1 (CTR1), da dessen Expression durch die intrazelluläre Cisplatinkonzentration vermindert und somit die weitere Pt-Aufnahme reduziert wird (Harrach and Ciarimboli, 2015; Schoeberl *et al.*, 2022). Die Beeinflussung diverser weiterer Transmembranproteine und Signalwege durch

die vorherrschende Pt-Konzentration und die sich durch initial entstandene DNA-Schäden und Reparaturmechanismen entwickelnde Cisplatinresistenz wurden bereits in verschiedenen Studien untersucht. Zusammenfassend ist jedoch festzuhalten, dass die Resistenzmechanismen von Cisplatin noch nicht vollständig aufgeklärt sind und neue Ansätze wie die metabolische Umprogrammierung (v.a. hinsichtlich des Glukose-, Aminosäure- und Fettstoffwechsels) weiter erschlossen und in zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollten (Wang *et al.*, 2021).

### **2.2.3. Auswertung aller Proben zu allen Zeitpunkten sowie nach Zeitpunkten und Gradings unter Einbeziehung des kompletten T1-Tumors**

Die Gd-Verteilung entsprach hierbei den Erwartungen, da nur funktionsfähige Hepatozyten in der Lage sind Gd aufzunehmen. Demgegenüber wäre zu erwarten gewesen, dass sich Pt in Tumorbereichen stärker anreichert als im Lebergewebe. Hier war jedoch die gemessene Durchschnittskonzentration in der Leber um 1,25 µg/g höher als im Tumorgewebe. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Studie von Theiner *et al.* (2018), die in ihrer präklinischen Studie zur Pt-Akkumulation im Colonkarzinom der Maus dieselben Beobachtungen machten. Ursächlich für die verminderte Pt-Aufnahme in Tumorgeweben gegenüber dem umgrenzenden Lebergewebe könnten unter anderem gestörte Aufnahme-mechanismen seitens der teilweise hochgradig zystisch, hämorrhagisch oder nekrotisch durchsetzten Tumorbereiche wie auch eine, aufgrund der fehlenden Embolisation nach Chemotherapeutikuminjektion, zu kurze Verweildauer des Chemotherapeutikums in der Tumorregion selbst sein.

Die unterschiedlichen Pt-Konzentrationen könnten mitunter ein Grund für das heterogene Verhalten und unterschiedliche Ansprechen des HCCs auf die Chemotherapie bzw. Chemoembolisation sein. Sie sollten in weiterführenden Studien zur Untersuchung der Aufnahmemechanismen von platinhaltigen Chemotherapeutika in Tumorgeweben berücksichtigt werden.

#### **2.2.4. Auswertung nach Entnahmezeitpunkt von 15 min und Grading unter Auswahl verschiedener Hotspots in T1-Tumoren**

Wie im entsprechenden Kapitel bereits ausführlicher erläutert wurde, sind weder die exakten Aufnahmemechanismen von Cisplatin in die Zelle noch die genauen Vorgänge der Resistenzentwicklung gegenüber seiner Anwendung komplett aufgeklärt (Gonzalez *et al.*, 2001; Ott and Gust, 2006; Eljack *et al.*, 2014; Shaloam and Tchounwou, 2014; Amable, 2016). Daher erfolgte die detaillierte Untersuchung von Tumoren desselben Entnahmezeitpunktes nach Grading vergleichend. Durch die Messung mehrerer ROIs in der Pt-LA-ICP-MS wurde aufgezeigt, dass intratumoral unterschiedliche Bereiche existieren, die mehr Pt aufnehmen konnten als andere. Diese Bereiche waren über die Pathohistologie alleinig nicht detektierbar und waren durch die Messung einer einzigen großen Tumor-ROI nicht darstellbar. Die Leber wies größtenteils ähnlich hohe oder sogar höhere Pt-Konzentrationen als die Tumore selbst auf, worauf bereits unter 2.2.3. eingegangen wurde. Diese Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit der Studie von Zhang *et al.* (2020), der die intratumorale Vaskularisation und Heterogenität beim HCC genauer untersuchte, dass die Untersuchung einzelner, kleinerer Tumorbereiche zukünftig von Interesse sein muss, wenn weiter aufgeklärt werden soll, warum spezielle Tumorzellen mehr Pt aufnehmen als andere.

#### **2.2.5. Histogrammdarstellung der unterschiedlichen Pt-Konzentrationen c ( $\mu\text{g/g}$ ) im Tumorgewebe von T1-Tumoren und Lebern nach dem Entnahmezeitpunkt von 15 min**

Durch Histogrammanalysen konnten die unterschiedlichen Verteilungsmuster der Elementakkumulationen in Tumor- und Leberproben dargestellt werden. Ebenso wie durch die Messung einzelner Tumor-ROIs zeigte sich dabei, dass bestimmte Tumore intratumoral unterschiedlich hohe Pt-Konzentrationen aufwiesen. Zur Bestätigung der durch diese Auswertung dargestellten Ergebnisse bedarf es vergleichender Untersuchungen.

#### **2.2.6. Qualitative P-Messung**

Phosphor ist Bestandteil jeder Zelle, da er unter anderem in DNA, Proteinen und Lipiden enthalten ist (Bäck and Michel, 2021). Die P-Messung wurde jeweils

parallel zum untersuchten Tumor- und Lebergewebe analysiert, um Rückschlüsse im Sinne einer adäquaten Probenablation ziehen zu können. Die P-Verteilung war in den gemessenen Proben überwiegend homogen. Bereiche mit schwachem P-Signal stellten insbesondere zystische oder nekrotische Bereiche, Bindegewebe sowie Schnittartefakte dar. Bereiche mit höherer Zelldichte und somit stärkerem P-Signal waren in Tumor- oder Lebergeweben detektierbar. Die Auswertung der P-Schnitte in heterogene und homogene Phosphorverteilungen erfolgte in der durchgeführten Studie subjektiv, da hierfür keine standardisierte Methode existiert. Daher müsste sie in weiterführenden Studien validiert und auf ihre Reproduzierbarkeit hin untersucht werden.

### 2.2.7. Quantitative Fe-, Cu- und Zinkmessungen

Für Fe ergab sich eine hohe Standardabweichung. Dies lässt sich damit erklären, dass in gewissen Leberbereichen (u.a. in Gefäßen) durch die Speicherung von Fe in Form von Hämoglobin in den Erythrozyten sehr hohe Fe-Konzentrationen vorzufinden waren. Im Tumorparenchym hingegen konnte oft nur ein geringes oder fast gar kein Eisensignal detektiert werden, da die Eisenspeicherkapazität der Leberzellen mit deren Differenzierungsgrad zusammenhängt. Daher fanden sich in Tumoren niedrigere Fe-Konzentrationen als in den Hepatozyten des umgebenen Leberparenchyms, die den wichtigsten Syntheseort für Ferritin darstellen. Sobald der Ferritinspeicher gesättigt ist, wird Fe in Form von Hämosiderin gespeichert und ist hieraus nur noch schlecht mobilisierbar (Anderson and Shah, 2013). Im angrenzenden Lebergewebe einiger Tumorproben konnten Hämosiderinablagerungen in der Kryo-HE detektiert werden (siehe Abbildung 48 2b). Aufgrund der sehr hohen Standardabweichungen eignete sich Fe eher zur qualitativen Beurteilung im Rahmen des Fibrose-Stagings als zur quantitativen Beurteilung.

Während ein Cu- und Fe-Überschuss zu oxidativem Stress in Geweben führt, besitzt Zink wichtige antioxidative Eigenschaften (Gaetke and Chow, 2003; Harro *et al.*, 2019). Cu konnte in einzelnen Bereichen bestimmter Tumor-ROIs in sehr hohen Konzentrationen, die möglicherweise mit einer erhöhten Malignität assoziiert sind, nachgewiesen werden. Zink, das als essenzielles Spurenelement ebenfalls analysiert wurde, da es einen wichtigen Bestandteil vieler Enzyme darstellt und an zahlreichen physiologischen Prozessen im Körper beteiligt ist, war in Tumoren in geringeren Mengen als in der Leber detektierbar. Dies deckt sich mit

der Studie von Harro *et al.* (2019), in der sie Konzentrationen von Kupfer, Eisen, Zink und Selen in HCCs und Lebergeweben von Hunden massenspektrometrisch untersuchten. Die genauen Ursachen für derartige Elementverteilungen sind bislang nicht aufgeklärt und benötigen weiterführende Untersuchungen. Denkbar wären neben mutierten oder defekten Mineraltransportproteinen eine beschleunigte Metabolisierungsrate im neoplastischen Gewebe (Harro *et al.*, 2019).

### **2.2.8. Detaillierte Auswertung der Kryo-HE von ausgewählten T1-Tumoren und Lebern mit auffälligen Pt-Verteilungen**

Die Kryo-HE erwies sich als hilfreiche Methode, die pathohistologischen Gegebenheiten in ausgewählten Tumorregionen mit unterschiedlichen Elementanreicherungen nachzuvollziehen und detaillierter zu untersuchen. Vergleichend zur Befundung des Kryo-HE-Schnittes wurden parallel die HE- und CD31-Färbung beurteilt. Auffallend war eine hochgradige Heterogenität der Elementverteilungen, die teilweise ohne erkennbare pathohistologische Grundlage auftraten. Es gestaltete sich schwierig, pathohistologische Veränderungen mit den gegebenen Pt-Konzentrationen schematisch zu korrelieren bzw. Ursachen für spezielle Konzentrationen zu konkretisieren. Die detailliertere Untersuchung der Heterogenität auf elementarer Ebene bedarf daher zukünftiger Studien mit weiterführenden Methoden, ggf. ergänzender pathohistologischer Färbungen.

### **2.3. Gesamtgehalte der Resttumore T2-T6**

Die Gesamtgehalte (SQ-ICP-MS) zeigten bezüglich der schwankenden Pt-Konzentrationen denselben Trend wie die orts aufgelösten Messungen (LA-ICP-MS) nämlich, dass Tumore mit höheren und mit niedrigeren Pt-Konzentrationen unabhängig von ihren Gradings existieren. Wie es dazu kommt, konnte anhand der in dieser Arbeit durchgeführten pathohistologischen Untersuchung nicht beantwortet werden.

Für die Gesamtgehaltmessung der Resttumore musste in der vorliegenden Arbeit das Leberrestgewebe, das zur Orientierung im LA-ICP-MS-Schnitt nötig war, nachträglich von den Kryoproben entfernt werden. Aufgrund der hohen Messwerte für Gd, welche im zeitlichen Verlauf sanken, ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass sich bei der Gesamtgehaltmessung der Resttumore noch Leberrestgewebe an den Tumorproben befand, da sich Gd aus dem Lebergewebe

im zeitlichen Verlauf auswäscht (Lee *et al.*, 2012; Ippolito *et al.*, 2018). Daher ist die Beurteilung der ermittelten Gd-Gesamtgehalte immer nur unter Vorbehalt und zu denselben Zeitpunkten vergleichend sinnvoll. Dies minimierte den analysierbaren Probenumfang der Untergruppen. Bei einer ausschließlichen Messung des Tumorgewebes wären aufgrund der dort vorhandenen pathologisch veränderten Hepatozyten niedrigere Gd-Konzentrationen zu erwarten gewesen.

Da es sich in der durchgeführten Studie um eine Orientierungsstudie handelte, sind die Ergebnisse im Sinne eines Pilotversuches zu betrachten. Es erfolgte ein umfassender Überblick der Pathohistologie inklusive Grading und Vaskularisationsbeurteilung sowie der Elementverteilungen in der LA-ICP-MS in den ausgewerteten Tumor- und Leberproben im DEN-induzierten HCC der Ratte. Um weitere Informationen über die *in vivo*-Pt-Akkumulation sowie deren pathohistologische Korrelation bzw. die Ursachen für unterschiedliche Konzentrationen, welche gegebenenfalls ohne pathohistologisch erkennbar zu sein auf molekularer Ebene ablaufen, zu gewinnen, müssen weiterführende Studien erfolgen.

### 3. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein präklinisches, katheter-basiertes Tiermodell im DEN-induzierten HCC der Ratte zur Analyse der Kontrastmittelverteilung und Chemotherapeutikaakkumulation in Tumoren mittels Bioimaging sowie die pathohistologische Korrelation zur Untersuchung von Tumorheterogenität und Tumorperfusion etabliert werden. Dabei lieferte die LA-ICP-MS neue Ergebnisse über zelluläre Gegebenheiten, die rein pathohistologisch nicht erfassbar waren, sondern auf elementarer Ebene abzulaufen scheinen. In der durchgeführten Studie wurde jeder Tumor mittig halbiert und je ein Teil für die Pathohistologie, der andere Teil als Kryo-Probe für die LA-ICP-MS weiterverarbeitet. Bestenfalls werden weitere Techniken etabliert, mit denen man Parallelschnitte von beiden Tumorthälften anfertigt, um so die in der CD31 gemessene Vaskularisation auf den für die LA-ICP-MS verwendeten Gewebeschnitt 1:1 übertragen zu können.

Ebenso könnten Markierungen im Tumor oder an den Tumorgrenzen (welche die Messungen jedoch nicht beeinflussen) eine Vereinfachung für die spätere

Orientierung bei vergleichenden Untersuchungen von LA-ICP-MS, Kryo- und Standard-HE- sowie CD31-Schnitt darstellen. Von Vorteil könnte sich bei derartig langen Messzeiten, wie sie bei der LA-ICP-MS bestehen, eine vorherige pathohistologische Befundung des zu untersuchenden Schnittes bzw. der Vergleich mehrerer Parallelschnitte erweisen, um ein repräsentatives Abbild der Elementverteilung durch den gesamten Tumor zu erhalten.

In weiterführenden Studien könnte aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen eine Embolisation vorgenommen werden, um zu untersuchen, ob sich dadurch dieselben heterogenen Akkumulationsmuster wie ohne Embolisat darstellen lassen, oder ob dabei höhere intratumorale Pt-Konzentrationen gemessen werden können.

Die Heterogenität des HCCs sowie eine fehlende Standardisierung in Bezug auf Untersuchungen und Auswertungen limitiert insbesondere Fortschritte in einer früheren HCC-Detektion, wie auch in der Therapieweiterentwicklung (Yamashita *et al.*, 2008; Ally *et al.*, 2017; Martins-Filho *et al.*, 2017; Bidkhorji *et al.*, 2018; Longerich, 2020; Leitlinienprogramm Onkologie, 2021).

Daher soll diese Arbeit eine Basis für weitere Studien schaffen, die sich mit der Heterogenität und dem Therapieansprechen des HCCs beschäftigen. Lediglich durch die zunehmende Standardisierung in allen Bereichen der HCC-Forschung und die Betrachtung seiner Komplexität aus verschiedenen Sichtweisen werden sich langfristig bahnbrechende Errungenschaften im Kampf gegen diese doch überwiegend noch infaust verlaufende Tumorerkrankung erzielen lassen.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt weltweit mit steigender Inzidenz und Mortalität eine der häufigsten tumorbedingten Todesursachen beim Menschen dar. Da es überwiegend in einem weit fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert wird, in dem keine kurative Therapie mehr möglich ist, bedarf es intensiver Forschung zur frühen Tumorprädiktion und Charakterisierung der Tumorheterogenität in fortgeschrittenen Tumoren.

In dieser Studie wurden die Elementkonzentrationen von endogenen und injizierten Substanzen mittels LA-ICP-MS in HCCs und dem angrenzenden Lebergewebe bestimmt. Die quantitativen Messungen wurden mit pathohistologischen Analysen korreliert. Die LA-ICP-MS ermittelte heterogene Elementkonzentrationen mit zunehmender Heterogenität in Tumoren höheren Gradings und fibrotischen Lebern. Weder das Grading noch der Zeitpunkt der Entnahme erlaubten die Identifizierung eines klaren Korrelationsmusters der Tumore. Wie erwartet nahm die Gd-Konzentration im Lebergewebe mit der Zeit nach der Injektion kontinuierlich ab. Außerdem übertrafen die Gd-Konzentrationen in der Leber die in den Tumoren um das  $\geq 10$ -fache. Überraschenderweise übertrafen die Gd-Konzentrationen in high-grade Tumoren diejenigen in low-grade Tumoren. LA-ICP-MS-Fe korrelierte semiquantitativ positiv mit dem Grad der Fibrose in der Leber und negativ mit der Gd-Konzentration. In Übereinstimmung mit anderen Studien wies die Leber überwiegend ähnliche oder sogar höhere Pt-Konzentrationen auf als die Tumore. Die Kryo-HE erwies sich als hilfreich, um pathohistologische Gegebenheiten in bestimmten Tumorregionen mit unterschiedlichen Elementkonzentrationen nachzuvollziehen, erforderte jedoch ein hohes Maß an Untersucherexpertise. Die Messungen des Gesamtgehalts stellten nur Durchschnittswerte der intratumoralen Elementkonzentrationen dar und lassen aufgrund der mangelnden räumlichen Auflösung wichtige Informationen auf regionaler Ebene außer Acht, die durch LA-ICP-MS sichtbar gemacht werden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es wichtig ist, jeden Tumor einzeln auf zellulärer Ebene zu untersuchen, bis die genaue Aufnahme und die Wirkmechanismen platinhaltiger Chemotherapeutika vollständig geklärt sind. LA-ICP-MS stellt eine sensitive Methode dar, um vorhandene Elementanreicherungen

---

im hepatozellulären Karzinom am Beispiel der gemessenen Gd-, Pt-, P-, Fe-, Cu- und Zn-Konzentrationen nachzuweisen und durch pathohistologische Korrelation neue Erkenntnisse über die Heterogenität des Tumors zu gewinnen.

## VII. SUMMARY

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common causes of tumor-related death in humans worldwide, with increasing incidence and mortality. Since it is predominantly diagnosed at an advanced tumor stage, where curative therapy is no longer possible, intensive research on early tumor prediction and the detection and characterization of tumor heterogeneity in advanced tumors are required.

In this study, elemental concentrations of endogenous and injected agents were determined by LA-ICP-MS in HCCs and the adjacent liver tissues. The quantitative measurements were correlated with pathohistological analyses. LA-ICP-MS detected heterogeneous element concentrations with increasing heterogeneity in higher grade tumors and fibrotic liver. Neither grading nor time of collection allowed the identification of a clear correlation pattern of tumors. However, as expected Gd-concentrations in liver tissue diminished continuously over time. Furthermore, Gd-concentrations in liver exceeded those in tumors  $\geq 10$ -fold. Surprisingly, Gd-concentrations in high-grade tumors superseded those in low-grade tumors. LA-ICP-MS-Fe correlated positively with the degree of fibrosis in the liver and negatively with Gd concentration. Consistent with other studies, the liver predominantly had similar or even higher Pt concentrations than the tumors. Cryo-HE proved helpful in tracing pathohistological conditions in specific tumor regions with different elemental concentrations but requires a high degree of investigator expertise. Total content measurements represented only averages of intratumoral elemental concentrations and, due to a lack of spatial resolution, ignore important information at the regional level that can be visualized by LA-ICP-MS.

In summary, it is important to investigate each tumor individually at the cellular level until the precise uptake and mechanisms of action of platinum-containing chemotherapeutic agents are fully elucidated. LA-ICP-MS represents a sensitive method to detect existing element accumulations in hepatocellular carcinoma using the example of measured Gd-, Pt-, P-, Fe-, Cu- and Zn-concentrations as well as to gain new insights regarding tumor heterogeneity by pathohistological correlation.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdelsalam, H., Emara, D.M. and Hassouna, E.M. (2022) 'The efficacy of TACE; how can automated feeder software help?', *Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine*, 53(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s43055-022-00720-4>.

Albert Schweitzer Stiftung für unsere Mitwelt: Schlachtzahlen 2020: fast 4 Mio. Tiere weniger (Online im Internet). Verfügbar unter: <https://albert-schweitzer-stiftung.de/aktuell/schlachtzahlen-2020> (abgerufen am 21. März 2022).

Ally, A. *et al.* (2017) 'Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma', *Cell*, 169(7), pp. 1327-1341.e23. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.046>.

Amable, L. (2016) 'Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine', *Pharmacological Research*, 106, pp. 27-36. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.001>.

Amable, L., Smith, S. and Stephan, C. (2017) 'New Research Evaluating Cisplatin Uptake in Ovarian Cancer Cells by Single Cell ICP-MS', *PerkinElmer*, pp. 1-6.

Anderson, E.R. and Shah, Y.M. (2013) 'Iron homeostasis in the liver', *Comprehensive Physiology*, 3(1), pp. 315-330. Available at: <https://doi.org/10.1002/cphy.c120016>.

Ayuso, C. *et al.* (2018) 'Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma (HCC): current guidelines', *European Journal of Radiology*, 101, pp. 72-81. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2018.01.025>.

Bäck, M. and Michel, J.B. (2021) 'From organic and inorganic phosphates to valvular and vascular calcifications', *Cardiovascular Research*, 117(9), pp. 2016-2029. Available at: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab038>.

Bahr, M.J. and Manns, M.P. (1999) 'Leberzirrhose', *Internist*, 40(12), pp. 1308-1322. Available at: <https://doi.org/10.1007/s001080050470>.

Becker, J.S., Matusch, A. and Wu, B. (2014) 'Bioimaging mass spectrometry of trace elements - recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review', *Analytica Chimica Acta*, 835, pp. 1-18. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.048>.

Becker, J Sabine *et al.* (2010) 'BIOIMAGING OF METALS BY LASER ABLATION INDUCTIVELY COUPLED PLASMA MASS SPECTROMETRY ( LA-ICP-MS )', pp. 156-175. Available at: <https://doi.org/10.1002/mas>.

Van Beers, B.E., Pastor, C.M. and Hussain, H.K. (2012) 'Primovist, eovist: What to expect?', *Journal of Hepatology*, 57(2), pp. 421-429. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.01.031>.

Bidkhorji, G. *et al.* (2018) 'Metabolic network-based stratification of hepatocellular carcinoma reveals three distinct tumor subtypes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(50), pp. E11874-E11883. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1807305115>.

Bösmüller, H. *et al.* (2018) 'Microvessel density and angiogenesis in primary hepatic malignancies: Differential expression of CD31 and VEGFR-2 in

hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma', *Pathology Research and Practice*, 214(8), pp. 1136–1141. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.06.011>.

Boyault, S. *et al.* (2007) 'Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets', *Hepatology*, 45(1), pp. 42–52. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.21467>.

Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), pp. 394–424. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.

Brockhurst, J.K. and Villano, J.S. (2021) 'The Role of Animal Research in Pandemic Responses', *Comparative Medicine*, 71(5), pp. 359–368. Available at: <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-21-000062>.

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR): Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2020 (Online im Internet). Verfügbar unter: [https://www.bf3r.de/de/verwendung\\_von\\_versuchstieren\\_im\\_jahr\\_2020-288932.html](https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2020-288932.html) (abgerufen am 20. März 2022).

Calderaro, J. *et al.* (2019) 'Molecular and histological correlations in liver cancer', *Journal of Hepatology*, 71(3), pp. 616–630. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.06.001>.

Chan, A.C.Y. *et al.* (2013) 'Evaluation of the seventh edition of the American Joint Committee on Cancer tumour-node-metastasis (TNM) staging system for patients undergoing curative resection of hepatocellular carcinoma: Implications for the development of a refined staging system', *Hpb*, 15(6), pp. 439–448. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2012.00617.x>.

Chan, E.S. and Yeh, M.M. (2010) 'The Use of Immunohistochemistry in Liver Tumors', *Clinics in Liver Disease*, 14(4), pp. 687–703. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2010.10.001>.

Chan, L.K. *et al.* (2021) 'Cellular heterogeneity and plasticity in liver cancer', *Seminars in Cancer Biology* [Preprint], (xxxx). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.02.015>.

Chanyaputhipong, J., Low, S.-C.A. and Chow, P.K.H. (2011) 'Gadoxetate Acid-Enhanced MR Imaging for HCC: A Review for Clinicians', *International Journal of Hepatology*, 2011, pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.4061/2011/489342>.

Chen, B. Bin and Shih, T.T.F. (2014) 'DCE-MRI in hepatocellular carcinoma-clinical and therapeutic image biomarker', *World Journal of Gastroenterology*, 20(12), pp. 3125–3134. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i12.3125>.

Chen, Y.W. *et al.* (2013) 'Assessment of blood flow in hepatocellular carcinoma: Correlations of computed tomography perfusion imaging and circulating angiogenic factors', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), pp. 17536–17552. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms140917536>.

Choi, W.T. and Kakar, S. (2017) 'Immunohistochemistry in the Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma', *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(2), pp. 311–325. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2017.01.006>.

- Culp, W.T. *et al.* (2021) 'Procedural description and prospective evaluation of Short-Term Outcome for the Use of Prostatic Artery', 259(10).
- Désert, R., Nieto, N. and Musso, O. (2018) 'Dimensions of hepatocellular carcinoma phenotypic diversity', *World Journal of Gastroenterology*, 24(40), pp. 4536–4547. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i40.4536>.
- Desmet, V.J. *et al.* (1994) 'Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging', *Hepatology*, 19(6), pp. 1513–1520. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.1840190629>.
- Díaz, L. *et al.* (2020) 'Ethical Considerations in Animal Research: The Principle of 3R's', *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 73(4), pp. 199–209. Available at: <https://doi.org/10.24875/RIC.20000380>.
- Ding, T. *et al.* (2011) 'Endothelium-coated tumor clusters are associated with poor prognosis and micrometastasis of hepatocellular carcinoma after resection', *Cancer*, 117(21), pp. 4878–4889. Available at: <https://doi.org/10.1002/cncr.26137>.
- Eljack, N.D. *et al.* (2014) 'Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin', *Metallomics*, 6(11), pp. 2126–2133. Available at: <https://doi.org/10.1039/c4mt00238e>.
- European Parliament (2020) 'Petition No 1125/2019 by Julia Baines (British), on behalf of PETA UK, PETA France, PETA Germany and PETA Netherlands, on a moratorium on animal experimentation. Petition No 0058/2020 by S.S. (German) on animal testing.', (June), pp. 2–5.
- European Parliament, 2019 (2019) '(EU) 2019/6', 2018(726), pp. 43–167.
- Friemel, J. *et al.* (2015) 'Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma', *Clinical Cancer Research*, 21(8), pp. 1951–1961. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0122>.
- Fujita, N. *et al.* (2020) 'Hyperintense liver masses at hepatobiliary phase gadoteric acid-enhanced MRI: Imaging appearances and clinical importance', *Radiographics*, 40(1), pp. 72–94. Available at: <https://doi.org/10.1148/rg.2020190037>.
- Gade, T.P.F., Hunt, S.J. and Harrison, N. (2017) 'Segmental Transarterial Embolization in a Translational Rat Model of Hepatocellular Carcinoma', *Physiology & behavior*, 176(3), pp. 139–148. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- Gaetke, L.M. and Chow, C.K. (2003) 'Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients', *Toxicology*, 189(1–2), pp. 147–163. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8).
- Galle, P.R. *et al.* (2018) 'EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma', *Journal of Hepatology*, 69(1), pp. 182–236. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.019>.
- Gisder, D.M., Tannapfel, A. and Tischoff, I. (2022) 'Histopathology of hepatocellular carcinoma - when and what', *Hepatoma Research* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2021.106>.
- Gonzalez, V.M. *et al.* (2001) 'Is cisplatin-induced cell death always produced by

apoptosis?', *Molecular Pharmacology*, 59(4), pp. 657–663. Available at: <https://doi.org/10.1124/mol.59.4.657>.

Gordon, S.G. and Miller, M.W. (2005) 'Transarterial coil embolization for canine patent ductus arteriosus occlusion', *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 20(3 SPEC. ISS.), pp. 196–202. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2005.05.008>.

Groß, C. *et al.* (2015) 'Model matters: Differences in orthotopic rat hepatocellular carcinoma physiology determine therapy response to sorafenib', *Clinical Cancer Research*, 21(19), pp. 4440–4450. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2018>.

Harrach, S. and Ciarimboli, G. (2015) 'Role of transporters in the distribution of platinum-based drugs', *Frontiers in Pharmacology*, 6(APR), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00085>.

Harro, C.C. *et al.* (2019) 'Hepatic copper and other trace mineral concentrations in dogs with hepatocellular carcinoma', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, (November 2018), pp. 2193–2199. Available at: <https://doi.org/10.1111/jvim.15619>.

Hectors, S.J. *et al.* (2017) 'Quantification of hepatocellular carcinoma heterogeneity with multiparametric magnetic resonance imaging', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02706-z>.

Heimbach, J.K. *et al.* (2018) 'AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma', *Hepatology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.29086>.

Huang, D.Q., El-Serag, H.B. and Loomba, R. (2021) 'Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 18(4), pp. 223–238. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00381-6>.

Iavarone, M. *et al.* (2010) 'Diagnosis of hepatocellular carcinoma in cirrhosis by dynamic contrast imaging: The importance of tumor cell differentiation', *Hepatology*, 52(5), pp. 1723–1730. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.23903>.

Ippolito, D. *et al.* (2018) 'Recent advances in non-invasive magnetic resonance imaging assessment of hepatocellular carcinoma', *World Journal of Gastroenterology*, 24(23), pp. 2413–2426. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i23.2413>.

Iwai, S. *et al.* (2015) 'Transcatheter arterial embolization for treatment of hepatocellular carcinoma in a cat', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 247(11), pp. 1299–1302. Available at: <https://doi.org/10.2460/javma.247.11.1299>.

Jiang, H.Y. *et al.* (2018) 'Noninvasive imaging of hepatocellular carcinoma: From diagnosis to prognosis', *World Journal of Gastroenterology*, 24(22), pp. 2348–2362. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i22.2348>.

Kaissis, G.A. *et al.* (2020) 'Combined DCE-MRI- and FDG-PET enable histopathological grading prediction in a rat model of hepatocellular carcinoma', *European Journal of Radiology*, 124(January), p. 108848. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2020.108848>.

Kim, J.H., Joo, I. and Lee, J.M. (2019) 'Atypical appearance of hepatocellular carcinoma and its mimickers: How to solve challenging cases using gadoxetic acid-enhanced liver magnetic resonance imaging', *Korean Journal of Radiology*, 20(7), pp. 1019–1041. Available at: <https://doi.org/10.3348/kjr.2018.0636>.

Kojiro, M. *et al.* (2009) 'Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: A report of the International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia', *Hepatology*, 49(2), pp. 658–664. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.22709>.

Kudo, M. *et al.* (2018) 'Orantinib versus placebo combined with transcatheter arterial chemoembolisation in patients with unresectable hepatocellular carcinoma (ORIENTAL): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 study', *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, 3(1), pp. 37–46. Available at: [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30290-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30290-X).

Lee, J.H. *et al.* (2012) 'Enhancement patterns of hepatocellular carcinomas on multiphasic multidetector row CT: Comparison with pathological differentiation', *British Journal of Radiology*, 85(1017), pp. 573–583. Available at: <https://doi.org/10.1259/bjr/86767895>.

Leela-Arporn, R. *et al.* (2019) 'Predictive factors of malignancy in dogs with focal liver lesions using clinical data and ultrasonographic features', *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(5), pp. 723–729. Available at: <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0673>.

Leitlinienprogramm Onkologie (2021) 'Konsultationsfassung Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome Wesentliche Neuerungen in der Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms', pp. 1–205.

Lencioni, R. *et al.* (2016) 'Sorafenib or placebo plus TACE with doxorubicin-eluting beads for intermediate stage HCC: The SPACE trial', *Journal of Hepatology*, 64(5), pp. 1090–1098. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.01.012>.

Liang, H. *et al.* (2021) 'Correlation of radiomic features on dynamic contrast-enhanced magnetic resonance with microvessel density in hepatocellular carcinoma based on different models', *Journal of International Medical Research*, 49(3). Available at: <https://doi.org/10.1177/0300060521997586>.

Lincke, T., Boll, D. and Zech, C. (2016) 'Bildgebung des hepatozellulären Karzinoms Imaging of hepatocellular carcinoma', pp. 295–310.

Liu, J., Dang, H. and Wang, X.W. (2018) 'The significance of intertumor and intratumor heterogeneity in liver cancer', *Experimental and Molecular Medicine*, 50(1), pp. e416–8. Available at: <https://doi.org/10.1038/emm.2017.165>.

Liu, K. *et al.* (2017) 'Targeting the vasculature in hepatocellular carcinoma treatment: Starving versus normalizing blood supply', *Clinical and Translational Gastroenterology*, 8(6), p. e98. Available at: <https://doi.org/10.1038/ctg.2017.28>.

Longerich, T. (2020) 'Hepatocellular carcinoma', *Pathologe*, 41(5), pp. 478–487. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00292-020-00801-z>.

Lu, L.C. *et al.* (2016) 'Tumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma: Facing

the challenges', *Liver Cancer*, 5(2), pp. 128–138. Available at: <https://doi.org/10.1159/000367754>.

Magee, P.N. and Barnes, J.M. (1956) 'The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine', *British Journal of Cancer*, 10(1), pp. 114–122. Available at: <https://doi.org/10.1038/bjc.1956.15>.

Marelli, L. *et al.* (2007) 'Transarterial therapy for hepatocellular carcinoma: Which technique is more effective? A systematic review of cohort and randomized studies', *CardioVascular and Interventional Radiology*, 30(1), pp. 6–25. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00270-006-0062-3>.

Marrero, J.A. *et al.* (2018) 'Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases', *Hepatology*, 68(2), pp. 723–750. Available at: <https://doi.org/10.1002/hep.29913>.

Martins-Filho, S.N. *et al.* (2017) 'Histological grading of hepatocellular carcinoma—a systematic review of literature', *Frontiers in Medicine*, 4(NOV), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00193>.

Matsui, O. *et al.* (2011) 'Hepatocellular nodules in liver cirrhosis: Hemodynamic evaluation (angiography-assisted CT) with special reference to multi-step hepatocarcinogenesis', *Abdominal Imaging*, 36(3), pp. 264–272. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00261-011-9685-1>.

Meyer, H.J., Garnov, N. and Surov, A. (2018) 'lo', *Translational Oncology*, 11(2), pp. 307–310. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.01.020>.

Moawad, A.W. *et al.* (2020) 'Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma; Pathophysiology, Targeted Therapy, and Role of Imaging', *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, Volume 7, pp. 77–89. Available at: <https://doi.org/10.2147/jhc.s224471>.

Morse, M.A. *et al.* (2019) 'The role of angiogenesis in hepatocellular carcinoma', *Clinical Cancer Research*, 25(3), pp. 912–920. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1254>.

Mossenta, M. *et al.* (2019) 'New insight into therapies targeting angiogenesis in hepatocellular carcinoma', *Cancers*, 11(8), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers11081086>.

Nolff, M.C. *et al.* (2018) 'Histomorphometric evaluation of MMP-9 and cd31 expression during healing under negative pressure wound therapy in dogs', *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 160(9), pp. 525–532. Available at: <https://doi.org/10.17236/sat00173>.

O'Rourke, J.M. *et al.* (2018) 'Carcinogenesis on the background of liver fibrosis: Implications for the management of hepatocellular cancer', *World Journal of Gastroenterology*, 24(39), pp. 4436–4447. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i39.4436>.

Obeid, M. *et al.* (2018) 'Translational Animal Models for Liver Cancer', *American Journal of Interventional Radiology*, 2(2), p. 2. Available at: <https://doi.org/10.25259/ajir-11-2017>.

Oishi, Y., Tani, K. and Taura, Y. (2018) 'Transcatheter arterial embolisation in four

dogs with hepatocellular carcinoma', *Journal of Small Animal Practice*, pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1111/jsap.12944>.

op den Winkel, M. *et al.* (2012) 'Prognosis of Patients with Hepatocellular Carcinoma. Validation and Ranking of Established Staging-Systems in a Large Western HCC-Cohort', *PLoS ONE*, 7(10), p. e45066. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045066>.

Ott, I. and Gust, R. (2006) 'Medizinische chemie der platin Komplexe', *Pharmazie in Unserer Zeit*, 35(2), pp. 124–133. Available at: <https://doi.org/10.1002/pauz.200500161>.

Petrizzo, A. and Buonaguro, L. (2016) 'Application of the Immunoscore as prognostic tool for hepatocellular carcinoma', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 4(1), pp. 1–4. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0182-5>.

Pfleging, W. *et al.* (2015) 'Surface micro-structuring of intercalation cathode materials for lithium-ion batteries: a study of laser-assisted cone formation', *Laser-based Micro- and Nanoprocessing IX*, 9351, p. 93511E. Available at: <https://doi.org/10.1117/12.2077763>.

Platzek, J. and Trentmann, W. (2013) 'Process for Preparing Crystalline 3,6,9-triaza-3,6,9- tris(carboxymethyl)-4-(4-ethoxybenzyl)undecanedioic Acid and Use for Production of Primovist®', *Google Patents 2013* [Preprint].

Pornwilar, M.-M. *et al.* (2013) 'Novel Bioimaging Techniques of Metals by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Diagnosis Of Fibrotic and Cirrhotic Liver Disorders', *PLoS ONE*, 8(3). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058702>.

Pugh, J.A.T. *et al.* (2012) 'Elemental imaging of MRI contrast agents: Benchmarking of LA-ICP-MS to MRI', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(6), pp. 1641–1649. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5973-z>.

Quan, Y. *et al.* (2021) 'Transcatheter arterial chemoembolization combined with Hippo/YAP inhibition significantly improve the survival of rats with transplanted hepatocellular carcinoma', *Lipids in Health and Disease*, 20(1), pp. 1–10. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01486-w>.

Raoul, J.L. *et al.* (2019) 'Updated use of TACE for hepatocellular carcinoma treatment: How and when to use it based on clinical evidence', *Cancer Treatment Reviews*, 72(August 2018), pp. 28–36. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.11.002>.

Rimola, J. (2020) 'Heterogeneity of Hepatocellular Carcinoma on Imaging', *Seminars in Liver Disease*, 40(1), pp. 61–69. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693512>.

Rogatko, C.P. *et al.* (2021) 'Drug-eluting bead chemoembolization for the treatment of nonresectable hepatic carcinoma in dogs: A prospective clinical trial', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(3), pp. 1487–1495. Available at: <https://doi.org/10.1111/jvim.16109>.

Rosenberg, B. *et al.* (1965) 'Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode', *Nature Publishing Group*, 205(5007), pp. 498–499. Available at: <https://doi.org/10.1038/205698a0>.

- Russell, W.M.S. and Burch, R.L. (1960) 'The Principles of Humane Experimental Technique', *Medical Journal of Australia*, 1(13), pp. 500–500. Available at: <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x>.
- Santos, N.P., Colaço, A.A. and Oliveira, P.A. (2017) 'Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review', *Tumor Biology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1177/1010428317695923>.
- Scansen, B.A. (2018) 'Cardiac Interventions in Small Animals: Areas of Uncertainty', *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 48(5), pp. 797–817. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.05.003>.
- Schalhorn, B. (2008) 'Gute Detektion und Charakterisierung von Lebermetastasen und HCC', *Kongress Report aktuell*, Nr. 1061.
- Scheuer, P.J. (1991) 'Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment', *Journal of Hepatology*, 13(3), pp. 372–374. Available at: [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(91\)90084-O](https://doi.org/10.1016/0168-8278(91)90084-O).
- Schirmacher, P., Fleig, W.E. and Dienes, H.P. (2004) 'Bioptische Diagnostik der Chronischen Hepatitis - Ergebnisse einer Evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und des Kompetenznetzes H', *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 42(2), pp. 175–185. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2004-812728>.
- Schlageter, M. *et al.* (2014) 'Histopathology of hepatocellular carcinoma', *World Journal of Gastroenterology*, 20(43), pp. 15955–15964. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i43.15955>.
- Schoeberl, A. *et al.* (2022) 'The copper transporter CTR1 and cisplatin accumulation at the single-cell level by LA-ICP-TOFMS', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9(November), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1055356>.
- Schuppan, D. and Afdhal, N.H. (2008) 'Liver cirrhosis', *The Lancet*, 371(9615), pp. 838–851. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60383-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60383-9).
- Semela, D. (2012) 'Angiogenesis in hepatocellular carcinoma development and progression', 35, pp. 108–112.
- Shah, S., Shukla, A. and Paunipagar, B. (2014) 'Radiological Features of Hepatocellular Carcinoma', *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 4(August), pp. S63–S66. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2014.06.009>.
- Shaloam, D. and Tchounwou, P.B. (2014) 'Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action', *European Journal of Pharmacology*, 740, pp. 364–378. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>. Cisplatin.
- Singal, A.G., Lampertico, P. and Nahon, P. (2020) 'Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends', *Journal of Hepatology*, 72(2), pp. 250–261. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.025>.
- Solaß, W. and Tannapfel, A. (2013) 'Histopathologie und Leberbiopsie des hepatozellulären Karzinoms', *Viszeralmedizin: Gastrointestinal Medicine and Surgery*, 29(2), pp. 78–83. Available at: <https://doi.org/10.1159/000350636>.
- Springer, S. *et al.* (2019) "'Patients' interests first, but . . ."—Austrian Veterinarians'

- Attitudes to Moral Challenges in Modern Small Animal Practice', *MDPI*, pp. 1–17.
- Sugimachi, Keishi *et al.* (2002) 'The mechanisms of angiogenesis in hepatocellular carcinoma: Angiogenic switch during tumor progression', *Surgery*, 131(1 SUPPL.), pp. 135–141. Available at: <https://doi.org/10.1067/msy.2002.119365>.
- Sung, H. *et al.* (2021) 'Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Sussulini, A., Becker, J. Susanne and Becker, J. Sabine (2015) 'LASER ABLATION ICP-MS: APPLICATION IN BIOMEDICAL RESEARCH', *Mass Spectrometry Reviews*, pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1002/mas.21481> In.
- Takahashi, Y. *et al.* (2021) 'Application of immunohistochemistry in the pathological diagnosis of liver tumors', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22115780>.
- TAMG, 2022 (2022) 'Gesetz über den Verkehr mit Tierarzneimitteln und zur Durchführung unionsrechtlicher Vorschriften betreffend Tierarzneimittel 1 (Tierarzneimittelgesetz-TAMG)', *MDPI*, pp. 1–56. Available at: [www.gesetze-im-internet.de](http://www.gesetze-im-internet.de).
- Theiner, S. *et al.* (2018) 'Tumor microenvironment in focus: LA-ICP-MS bioimaging of a preclinical tumor model upon treatment with platinum (IV) -based anticancer agents', 7(8), pp. 1256–1264. Available at: <https://doi.org/10.1039/c5mt00028a>.Tumor.
- Thoolen, B. *et al.* (2010) 'Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system', *Toxicologic Pathology*, 38(7 SUPPL.), pp. 5–81. Available at: <https://doi.org/10.1177/0192623310386499>.
- Thoolen, B. *et al.* (2012) 'Comparative histomorphological review of rat and human hepatocellular proliferative lesions', *Journal of Toxicologic Pathology*, 25(3), pp. 189–199. Available at: <https://doi.org/10.1293/tox.25.189>.
- Tierschutz- Versuchstierverordnung (2013) 'Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren ( Tierschutz- Versuchstierverordnung - TierSchVersV )', pp. 1–25.
- Tolba, R. *et al.* (2015) 'Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice', *Laboratory Animals*, 49, pp. 59–69. Available at: <https://doi.org/10.1177/0023677215570086>.
- Torbenson, M. *et al.* (2019) 'WHO Classification of Digestive system tumours', *WHO Classification of Tumours Editorial Board*, 5th Editio, pp. 229–239.
- Vermeulen, P.E. *et al.* (1996) 'Quantification of angiogenesis in solid human tumours: An international consensus on the methodology and criteria of evaluation', *European Journal of Cancer Part A*, 32(14), pp. 2474–2484. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(96\)00379-6](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(96)00379-6).
- Vogl, T.J. *et al.* (2007) 'Transarterielle chemoembolisation (TACE) des hepatozellulären karzinoms: Technik, indikationsstellung und ergebnisse', *RoFo Fortschritte auf dem Gebiet der Rontgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren*,

179(11), pp. 1113–1126. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2007-963285>.

Vogl, T.J. *et al.* (2016) ‘Transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma in a rat model: The effect of additional injection of survivin siRNA to the treatment protocol’, *BMC Cancer*, 16(1), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2357-3>.

Wang, L. *et al.* (2021) ‘The Role of Tumour Metabolism in Cisplatin Resistance’, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8(June), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.691795>.

WHO (2020) ‘Liver Cancer Global WHO Report’, 419, pp. 1–2. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>.

Yamashita, T. *et al.* (2008) ‘EpCAM and  $\alpha$ -fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma’, *Cancer Research*, 68(5), pp. 1451–1461. Available at: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6013>.

Yang, B. *et al.* (2020) ‘Transarterial strategies for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: A systematic review’, *PLoS ONE*, 15(2), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227475>.

Yang, J.D. *et al.* (2019) ‘A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management’, 16(10), pp. 589–604. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0186-y.A>.

Yang, W. *et al.* (2012) ‘Estrogen represses hepatocellular carcinoma (HCC) Growth via Inhibiting Alternative Activation of Tumor-associated Macrophages (TAMs)’, *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), pp. 40140–40149. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.348763>.

Yang, Z.F. and Poon, R.T.P. (2008) ‘Vascular changes in hepatocellular carcinoma’, *Anatomical Record*, 291(6), pp. 721–734. Available at: <https://doi.org/10.1002/ar.20668>.

Zhang, Q., Wu, J., *et al.* (2020) ‘Evaluation of Intra-Tumoral Vascularization in Hepatocellular Carcinomas’, *Frontiers in Medicine*, 7(October), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.584250>.

Zhang, Q., Lou, Y., *et al.* (2020) ‘Intratumoral heterogeneity of hepatocellular carcinoma: From singlecell to population-based studies’, *World Journal of Gastroenterology*, 26(26), pp. 3720–3736. Available at: <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i26.3720>.

Zhong, X. *et al.* (2020) ‘Differentiation of Small Hepatocellular Carcinoma From Dysplastic Nodules in Cirrhotic Liver: Texture Analysis Based on MRI Improved Performance in Comparison Over Gadoteric Acid-Enhanced MR and Diffusion-Weighted Imaging’, *Frontiers in Oncology*, 9(January), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01382>.

Zhou, J. *et al.* (2020) ‘Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma (2019 Edition)’, *Liver Cancer*, 9(6), pp. 682–720. Available at: <https://doi.org/10.1159/000509424>.

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und Übersicht kooperierender Institute (Klinikum rechts der Isar der TU München hellgrau, WWU und Universitätsklinikum Münster dunkelgrau hinterlegt).....</b>	<b>7</b>
<b>Abbildung 2: Veränderung der Gefäßversorgung im Zuge der Hepatokarzinogenese (Matsui <i>et al.</i>, 2011, S. 270).....</b>	<b>12</b>
<b>Abbildung 3: HCC-Subtypen nach Longerich: a makrotrabekuläres HCC, b AFP-Expression, c steatohepatitisches HCC, d klarzelliges HCC, e chromophobes HCC, f lymphozytenreiches HCC; (Originalvergrößerung 200:1) (Longerich, 2020, S. 41).....</b>	<b>14</b>
<b>Abbildung 4: Übersicht der molekularen Subgruppen einschließlich der Darstellung histologischer Merkmale, transkriptomischer Klassifizierung und genetischen Veränderungen des HCCs (Calderaro <i>et al.</i>, 2019, S. 618).....</b>	<b>15</b>
<b>Abbildung 5: Korrelation zwischen dem kontinuierlichen Prozess der Hepatokarzinogenese vom low-grade dysplastischen Knoten (low grade DN) bis zum fortgeschrittenen HCC (progressed HCC) inkl. der Veränderung der Gefäßversorgung (Vascular supply) sowie Transporterverteilung (OATP, MRP) und dem Grad der Heterogenität bei der kontrastmittelverstärkten Bildgebung in der arteriellen, portalvenösen und hepatobiliären (HB) Phase (Rimola, 2020, S. 65).....</b>	<b>17</b>
<b>Abbildung 6: Strukturformel von Cisplatin.....</b>	<b>18</b>
<b>Abbildung 7: Strukturformel von Primovist® (Platzek and Trentmann, 2013, S. 1).....</b>	<b>20</b>
<b>Abbildung 8: Kontrastmittelverhalten des HCCs in der MRT: (1) T2w-Bildgebung zeigt eine hyperintense Masse; (2) Arterielle Phase mit Hyperenhancement und Wash-out in der (3) portalvenösen und (4) spätvenösen Phase. (3) Kapselverstärkung (breiter Pfeil) und (4) intratumorale fibröse Septen (schmale Pfeile); (5) Hypointense Masse in der hepatobiliären Phase mit Kontrastmittelumkehr (Kim, Joo and Lee, 2019, S. 1020).....</b>	<b>21</b>
<b>Abbildung 9: Übersicht der beteiligten Transporter der Gadoxetsäureaufnahme und -abgabe von vitalen Hepatozyten (Fujita <i>et al.</i>, 2020, S. 3).....</b>	<b>23</b>
<b>Abbildung 10: Diagnosealgorithmus des HCCs im Hintergrund einer Leberzirrhose nach neuer Leitlinie 2021 (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021, S. 49).....</b>	<b>25</b>
<b>Abbildung 11: TNM-Klassifikation des HCCs (Petrizzo and Buonaguro, 2016, S. 2, Table 1).....</b>	<b>28</b>
<b>Abbildung 12: Fibrose-Staging (Leber mit chronischer Hepatitis, modifizierte Gomori-Färbung) mit (A) Stadium 1, (B) Stadium 2 und (C) Stadium 3 Fibrose sowie (D) Stadium 4 Zirrhose nach Desmet</b>	

und Scheuer (Schirmacher, Fleig and Dienes, 2004, S. 182) .....	31
<b>Abbildung 13: Histologisches Grading des HCCs nach WHO-Klassifikation; (A) gut differenziertes, (B) mäßig differenziertes und (C) schlecht differenziertes HCC (Gisder, Tannapfel and Tischoff, 2022, S. 8)....</b>	<b>32</b>
<b>Abbildung 14: Typische Wachstumsmuster des HCCs: (A) Trabekulär, (B) pseudoglandulär und (C) solide (Schlageter et al., 2014, S. 15958) .....</b>	<b>35</b>
<b>Abbildung 15: Muster von Mikrogefäßen beim HCC in der IHC: (a) kapillarähnliche und (b) sinusoidähnliche Mikrogefäße (Zhang et al., 2020, S. 5).....</b>	<b>38</b>
<b>Abbildung 16: CD31 eines (A) HCCs und (B) des umgebenden Leberparenchyms (Chen <i>et al.</i>, 2013, S. 17540) .....</b>	<b>39</b>
<b>Abbildung 17: Schematische Darstellung eines LA-ICP-MS-Systems (Pflöging et al., 2015, S. 3) .....</b>	<b>43</b>
<b>Abbildung 18: Übersicht der Versuchstierzahlen sowie Tumorproben (T1-T6) zur massenspektrometrischen und pathohistologischen Evaluation.....</b>	<b>51</b>
<b>Abbildung 19: Aufzeichnungsbogen zur Gewichtsentwicklung der Tiere .....</b>	<b>53</b>
<b>Abbildung 20: Score Sheet zur Überwachung des Gesundheitszustandes der Tiere .....</b>	<b>54</b>
<b>Abbildung 21: Screening und DCE-Bildgebung eines Versuchstieres mit markierten Tumoren T1 und T2: (1) Screening (Serie 2, Image 18, hyperintens zum Leberhintergrund), (2) DCE-Bildgebung (Serie 4, Image 13, isointens zum Leberhintergrund) mit (3) Hyperenhancement (Serie 4, Image 38, hyperintens zum Leberhintergrund) und (4) Wash-out (Serie 4, Image 70, isointens zum Leberhintergrund) sowie (5) Kontrastmittelumkehr (Serie 4, Image 148, hypointens zum Leberhintergrund) .....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 22: Chirurgischer Zugang zur Darstellung und Punktion der A. carotis communis sinistra sowie Verschieben und Fixation des Plastikvenenkatheters intraarteriell (rechtsseitig cranial, linksseitig caudal).....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 23: a) Übersicht der Aorta abdominalis mit Aortenbogen und b) vergrößerter Ausschnitt der Katheterisierung eines Versuchstieres mit Darstellung der Aorta abdominalis (AA) sowie der Katheterspitze (*) im Truncus coeliacus inklusive der Aufzweigung der A. hepatica communis in die A. hepatica dextra (RHA) und A. hepatica sinistra (LHA) .....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 24: Beispiel von Standbildern einer akquirierten Durchleuchtungsserie und Anflutung des Kontrastmittels im Tumorknoten (siehe *).....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 25: a) Screening (Serie 2, Image 7, Tumore (T1-T3) hyperintens zum Leberhintergrund) und b) DSA-Standbild mit markierten Tumoren (T1-T3) sowie c) Tumore in situ (Pfeile) .....</b>	<b>64</b>

<b>Abbildung 26: Verwendete Instrumente: (1) Mikroklemmen, (2) Spreizer, (3) Haltezügel, (4) Anatomische Pinzette und Mikro-Pinzetten, (5) Chirurgische Scheren, (6) Klemmen nach Backhaus und (7) Mikro-Scheren.....</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 27: HE-Standardprotokoll .....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 28: CD31 mit eingezeichnetem Tumor (grüne Linie) sowie ausgewählter ROIs (bunte Kästen) in Tumor- und angrenzendem Lebergewebe: a) je 5 Tumor- und Leber-ROIs, b) 5 Tumor- und 3 Leber-ROIs; Beispiele ausgeschlossener Proben (c, d) aufgrund großer intratumoraler Nekrosebereiche; Skala 3 µm .....</b>	<b>72</b>
<b>Abbildung 29: Gegenüberstellung eines G1 (links), G2 (mittig) und G3 (rechts) HCCs (von oben nach unten: HE, CD31, Kryo-HE mit markiertem T1 (weiß gestrichelte Linie), LA-ICP-MS-Gd, LA-ICP-MS-Pt mit Darstellung der schwachen (lila/dunkelblau) bis starken (hellgrün) Cisplatin- Anreicherung im Tumorgewebe sowie einem Überlagerungsbild (Overlay) von Gd (rot) und Pt (blau) .....</b>	<b>79</b>
<b>Abbildung 30: Screenshot eines über die <i>ImaJar</i> Software dargestellten Tumors mit Einzeichnung einer ROI im Tumor für Gd (a) und Pt (c) sowie in der angrenzenden Leber für Gd (b) und Pt (d) inkl. Histogrammdarstellung und Intensitäten für die gemessenen ROIs mit e) I avg und f) I stdev .....</b>	<b>80</b>
<b>Abbildung 31: HE-Färbung (a-c) und CD31-Färbung (d-f) eines G1, G2 und G3 HCCs mit 20x-Vergrößerungen .....</b>	<b>83</b>
<b>Abbildung 32: HE (a-d) und CD31 (e-h) mit entsprechendem Positivem Pixel Count (PPC) (i-l) zur Visualisierung der Vaskularisation eines G1, G2 und G3 HCCs sowie Lebergewebes bei 40-facher Vergrößerung (Skala 60 µm).....</b>	<b>84</b>
<b>Abbildung 33: Darstellung der Gefäße eines peritumoralen Areals mit dunkel angefärbten dickwandigen Arterien (rote Pfeile), heller angefärbten dünnwandigen Venen (blaue Pfeile) sowie Gallengängen (grüne Pfeile) ohne CD31-Positivität bei 20x-Vergrößerung.....</b>	<b>85</b>
<b>Abbildung 34: Gruppierung der Positivity in % aus PPC nach Grading für T1-T6 HCCs und Leber (a) sowie T1 HCCs und Leber (b); dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung; *signifikanter Unterschied zwischen G2 und G3 HCCs und Leber (a) sowie zwischen G3 HCCs und Lebergewebe (b) mit <math>p &lt; 0,0001</math> .....</b>	<b>86</b>
<b>Abbildung 35: Desmet/Scheuer-Score (Grad 0-4) zur Fibrosegradbestimmung der Hintergrundleber mithilfe der LA-ICP-MS-Eisenmessung .....</b>	<b>87</b>
<b>Abbildung 36: Korrelation der Gd-Konzentrationen des nicht-tumorösen Lebergewebes in µg mit dem Fibrosegrad (<math>r_s = -0,8840</math>, <math>p &lt; 0,001</math>; <math>n = 16</math>).....</b>	<b>87</b>
<b>Abbildung 37: Gegenüberstellung der ermittelten Gd- und Pt-Mittelwerten (µg/g) von T1-Tumoren und Lebergewebe, dargestellt mit Standardabweichung .....</b>	<b>88</b>

- Abbildung 38:** Gegenüberstellung der Gd-Mittelwerte ( $\mu\text{g/g}$ ) aus Tabelle 9 von T1-Tumoren (G1/2 und G3) und Lebergewebe im zeitlichen Verlauf .....90
- Abbildung 39:** Gegenüberstellung der Pt-Mittelwerte ( $\mu\text{g/g}$ ) aus Tabelle 9 von T1-Tumoren (G1/2 und G3) und Lebergewebe im zeitlichen Verlauf .....90
- Abbildung 40:** Gegenüberstellung der Gd- und Pt-Konzentrationen verschiedener kleiner ROIs (a,b) in T1-Tumoren (gruppiert nach Grading) aus Tabelle 10 (zum Zeitpunkt 15 min nach Injektion), sowie einer singulären Gesamtflächen T1-ROI (c,d); dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung .....92
- Abbildung 41:** Gegenüberstellung der Gd- (a) und Pt-Konzentrationen (b) verschiedener kleiner ROIs im Lebergewebe aus Tabelle 10 (zum Zeitpunkt 15 min nach Injektion), sowie einer singulären Gesamtflächen Leber-ROI; dargestellt mit Mittelwert und Standardabweichung .....93
- Abbildung 42:** Gegenüberstellung eines G1 (oben), G2 (mittig) und G3 (unten) HCCs (von links nach rechts: Kryo-HE (Skala 1 mm), LA-ICP-MS Gd, Pt, Fe und P mit Darstellung der geringgradigen (lila/dunkelblau) bis hochgradigen (hellgrün bis vereinzelt gelb/orange/rot) Pt-Anreicherung im Tumor (weiß gestrichelte Linie) und zum Teil angrenzenden Lebergewebe zum Entnahmezeitpunkt nach 15 min sowie exemplarischer Einzeichnung dreier Tumor-ROIs (ROI 1-3) mit unterschiedlichen Pt-Konzentrationen im G3 HCC...94
- Abbildung 43:** Histogramme ausgewählter T1-Tumore und Lebern zur Darstellung der Cisplatin-Verteilung; n = Anzahl der Pixel, c = Konzentration Pt in  $\mu\text{g/g}$ : a) G1 HCC (15 min) und b) G2 HCC (15 min) mit rechtsschiefer Verteilung, c) G3 HCC (15 min) mit symmetrischer und d) (15 min) rechtsschiefer Verteilung, e) und f) Lebern (15 min) mit symmetrischer Verteilung, g) G3 HCC (30 min) mit bimodaler Verteilung, h) G3 HCC (15 min) mit niedriger, rechtsschiefer Verteilung.....96
- Abbildung 44:** ausgewählte T1-Tumore (weiß gestrichelte Linie) mit Kryo-HE (a-d), Gd- (e-h), Pt- (i-l) und P- (m-p) Konzentrationen; Demonstration der m) geringgradigen, n) mittelgradigen und o) hochgradigen homogenen sowie p) heterogenen P-Verteilungen.....97
- Abbildung 45:** Gegenüberstellung der ermittelten Fe-, Cu- und Zn-Mittelwerte ( $\mu\text{g/g}$ ) von T1-Tumoren und Lebergewebe .....98
- Abbildung 46:** T1-Tumore (weiß gestrichelte Linie) der Ratten D45, D42 und D18 (oben) mit Kryo-HE (a-c), Gd- (d-f), Pt- (g-i) Fe- (j-l), Cu- (m-o) und Zn- (p-r) Konzentrationen sowie Leberproben der Ratten D45, D42 und D18 (unten) mit Kryo-lichtmikroskopischer (LM)-Abbildung (a-c), Gd- (d-f), Pt- (g-i) Fe- (j-l), Cu- (m-o) und Zn- (p-r) Konzentrationen zur Demonstration der unterschiedlichen Elementverteilungen; Erläuterungen zu weiteren Markierungen (1, 2, \*) siehe Fließtext.....99
- Abbildung 47:** D7 T1 (weiß gestrichelte Linie) mit Kryo-HE (a), Gd- (b), Pt-

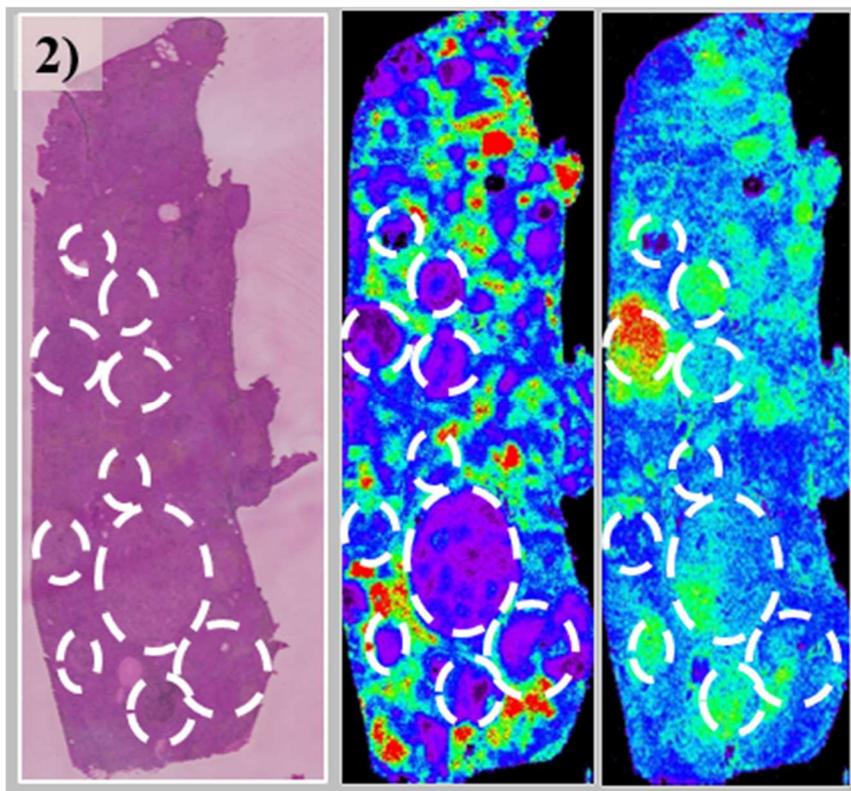
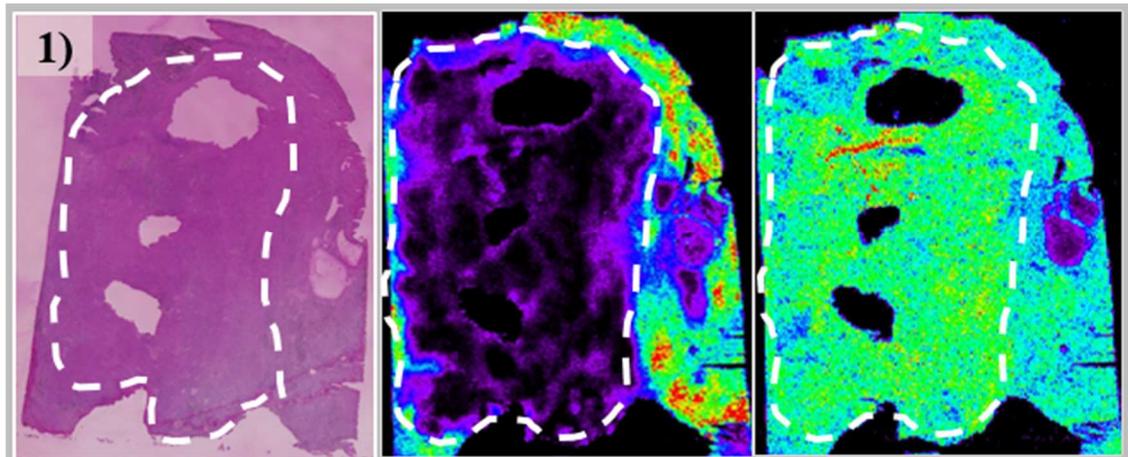
- (c) und P- (d) LA-ICP-MS sowie vergrößerten Ausschnitten der Kryo-HE (1-4) in Bereichen mit unterschiedlichen Pt-Akkumulationen (1-3) und angrenzender Leber (4) bei 40x-Vergrößerung; weiße Doppelsternchen: ggr. Pt-Akkumulation, schwarze Sternchen: mgr.-hgr. Pt-Akkumulation.....102
- Abbildung 48:** D46 T1 (weiß gestrichelte Linie) mit Kryo-HE (a), Gd- (b), Pt- (c) und P- (d) LA-ICP-MS sowie vergrößerten Ausschnitten der Kryo-HE aus dem Tumorbereich (1) und angrenzender Leber (2) bei 10x- (1a, 2a) und 40x-Vergrößerung inkl. exemplarisch markierter neutrophiler Granulozyten (1b) und Hämosiderineinlagerungen (2b) in schwarzen Kästen .....103
- Abbildung 49:** D40 T1 und Leber mit Kryo-HE (a), Gd- (b), Pt- (c) und P- (d) LA-ICP-MS sowie vergrößerten Ausschnitten der Kryo-HE aus dem Tumorbereich ohne morphologische Unterschiede in Bereichen mit vermehrter (1) bzw. verminderter (2) Pt-Akkumulation; Leberprobe (1-4) mit G3 HCCs mit verminderter (1) und vermehrter (2) Pt-Akkumulation sowie einem FCA (3) ohne und Lebergewebe (4) mit erhöhter Gd-Akkumulation bei 40x-Vergrößerung .....105
- Abbildung 50:** D21 T1 mit Kryo-HE (a), Gd- (b)-, Pt- (c) und P- (d) LA-ICP-MS sowie vergrößerten Ausschnitten der Kryo-HE aus dem Tumorbereich mit 10 eingezeichneten ROIs (weiß gestrichelte Kreise) sowie exemplarischen Ausschnitten: (1) homogenes Grad 3 HCC, (3) Grad 3 HCC mit zystischer Dilatation, (5) Grad 3 HCC mit Nekrosen (rötlich), (6) Grad 3 HCC mit Gefäßeinbruch, (8) Grad 3 HCC mit erhöhter Anzahl atypischer Mitosen, Riesenzellen sowie erhöhter Basophilie.....106
- Abbildung 51:** T1- und Leberproben der Kontrolltiere D35 und D43 zur Darstellung der Elementverteilungen: 1-4) Kryo-HE von T1 (weiß gestrichelte Linie) und Lebern mit a) Gd, b) Pt, c) Fe, d) Cu, e) Zn und f) P-Verteilung .....108
- Abbildung 52:** Übersicht der Gesamtgehalte der Gd-(rot) und Pt-(schwarz) - Konzentrationen der T2-T6 Tumore gruppiert nach Grading und Entnahmezeitpunkten: a) G3 HCCs nach 15 - 20 min, b) G1 und G2 HCCs nach 15 - 20 min, c) G3 HCCs nach 30 - 60 min und d) G1 HCC nach 30 min.....109
- Abbildung 53:** Kryo-HE (a-f) und Gd- (g-l), Pt- (m-r), und P- (s-x) LA-ICP-MS der T1 (weiß gestrichelte Linie) und Leberproben von D25, D27 und D28 zum Entnahmezeitpunkt nach 15, 30 und 60 min mit abfallenden Gd-Konzentrationen (h, j, l).....110

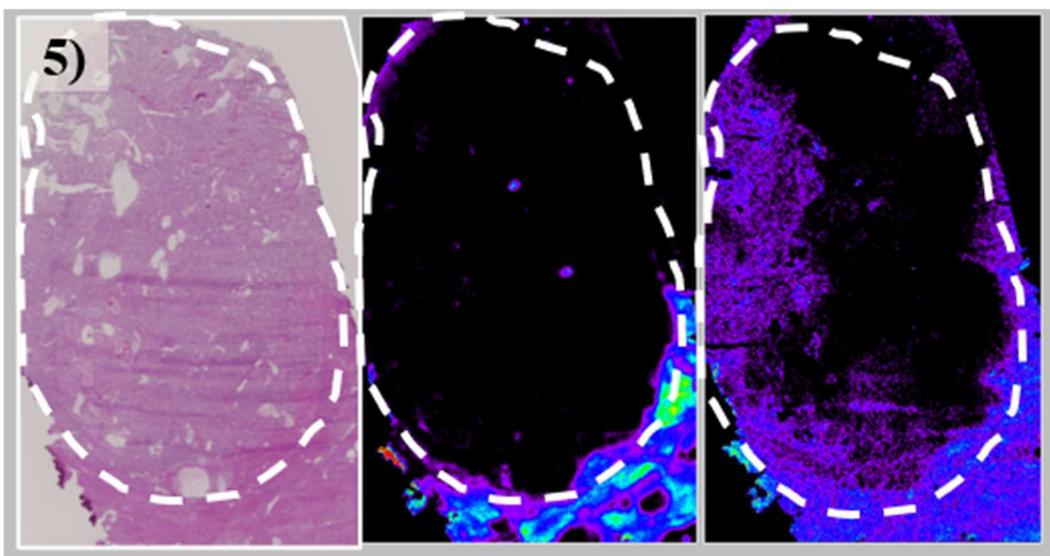
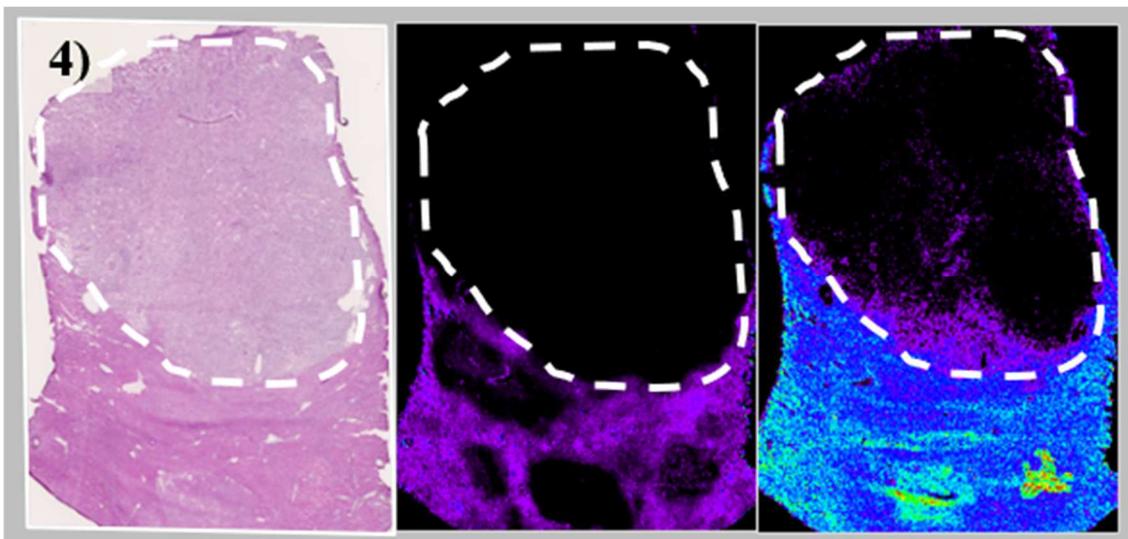
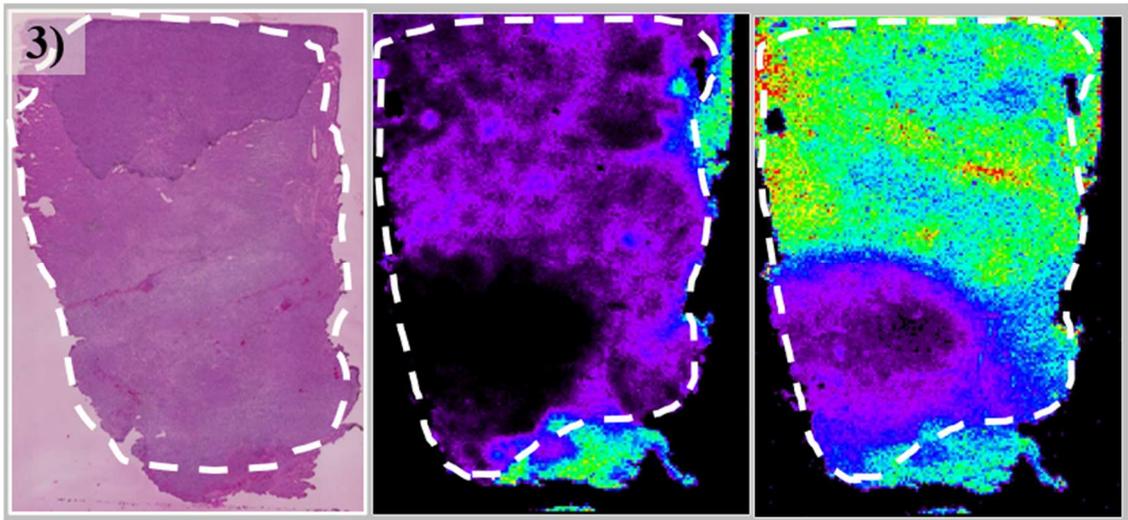
## **X. TABELLENVERZEICHNIS**

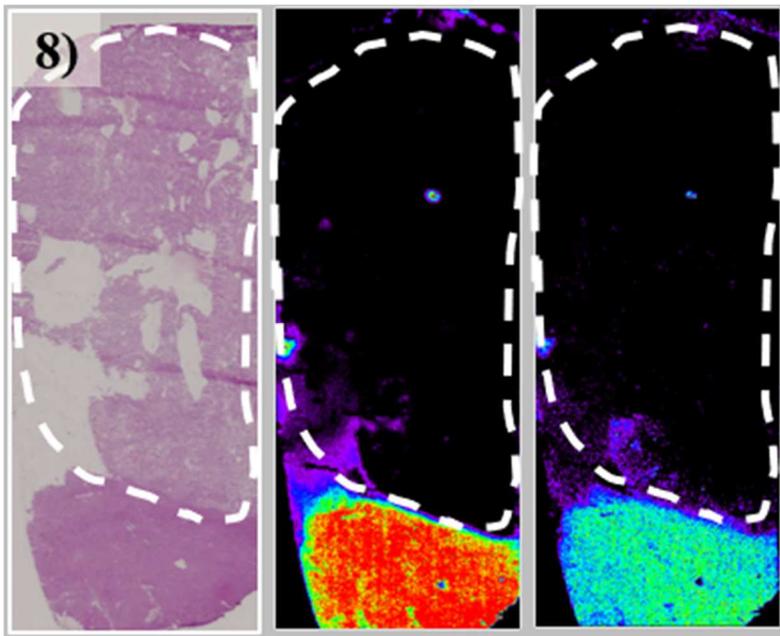
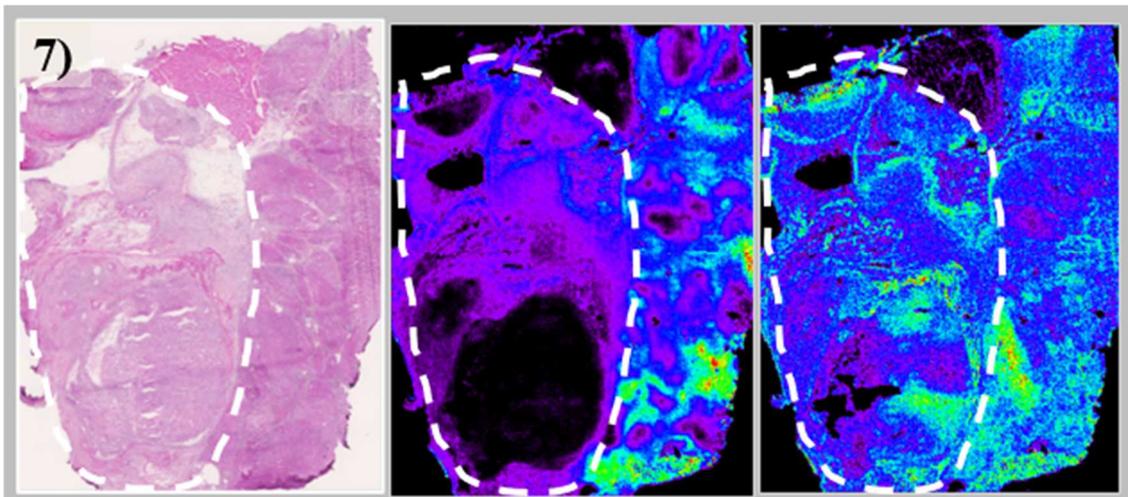
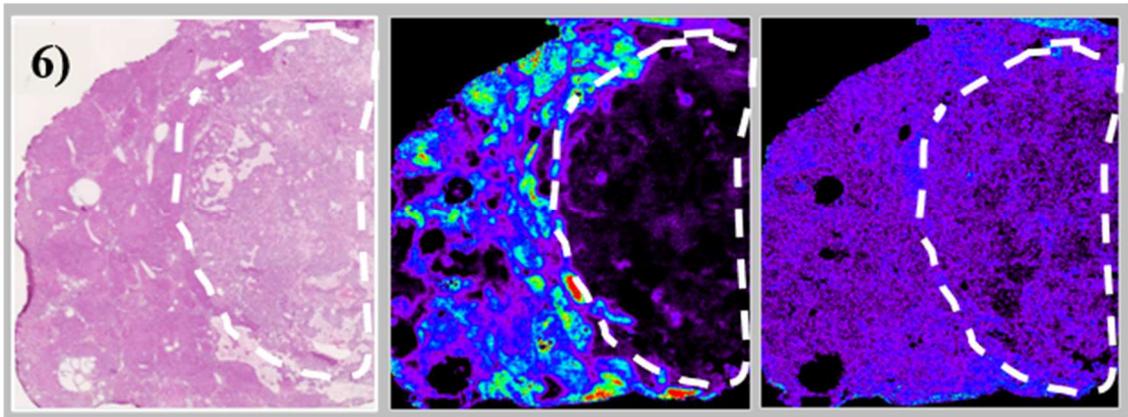
<b>Tabelle 1: Histopathologische Unterschiede zwischen L-DN und H-DN.....</b>	<b>11</b>
<b>Tabelle 2: Übersicht des HCC-Gradings nach ES und WHO .....</b>	<b>32</b>
<b>Tabelle 3: Einstellung der Angiographiebildgebung .....</b>	<b>62</b>
<b>Tabelle 4: Übersicht der angefertigten Schnitte.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabelle 5: Übersicht über verwendete Antikörper und Protokoll einschließlich Ursprung, Hersteller, Verdünnung und Vorbehandlung .....</b>	<b>69</b>
<b>Tabelle 6: Schritte, Reagenzien, Lieferanten, Temperatur und Inkubationszeiten des Protokolls „ICH Rabbit polymer“ .....</b>	<b>70</b>
<b>Tabelle 7: Übersicht der Parameter des modifizierten positiven Pixel Count v9 für die Erfassung der Tumervaskularisation in der CD31-Färbung.....</b>	<b>71</b>
<b>Tabelle 8: Übersicht bei LA-ICP-MS und SQ-ICP-MS verwendeter interner Standards inkl. Eigenschaften und Herstellerangaben .....</b>	<b>77</b>
<b>Tabelle 9: Übersicht der gemessenen Mittelwerte inkl. Standardabweichung der Gd- und Pt-Konzentrationen in Lebergewebe und T1-Tumoren nach Grading und Entnahmezeitpunkt (Grad 1 und 2 sind aufgrund der geringen Probenzahl zusammengefasst dargestellt) .....</b>	<b>89</b>
<b>Tabelle 10: Übersicht der gemessenen Mittelwerte inkl. Standardabweichung der Gd- und Pt-Konzentrationen in Lebergewebe und T1-Tumoren nach Grading und Entnahmezeitpunkt von 15 min (Grad 1 und 2 sind aufgrund der geringen Probenzahl zusammengefasst worden) .....</b>	<b>91</b>

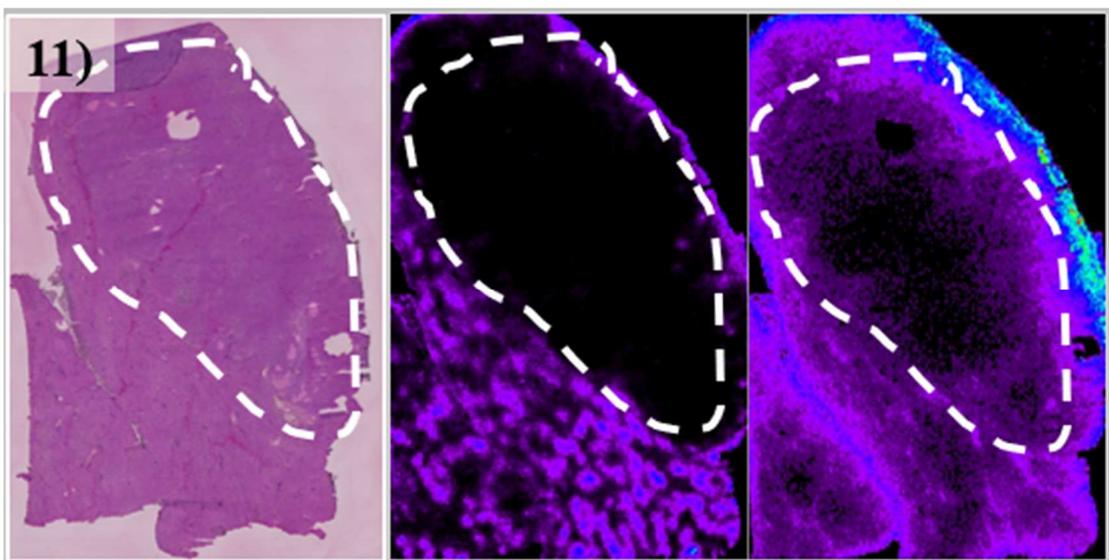
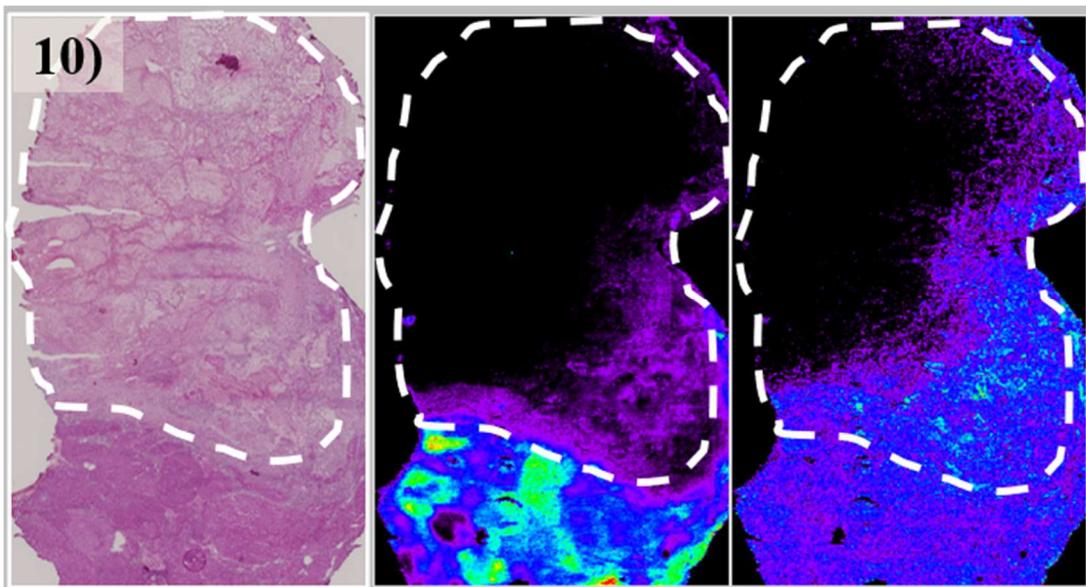
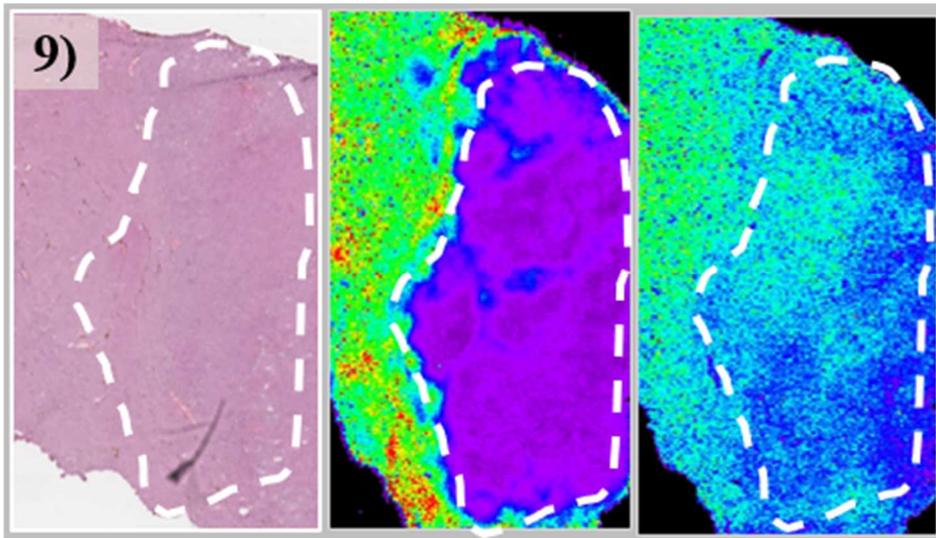
**XI. ANHANG**

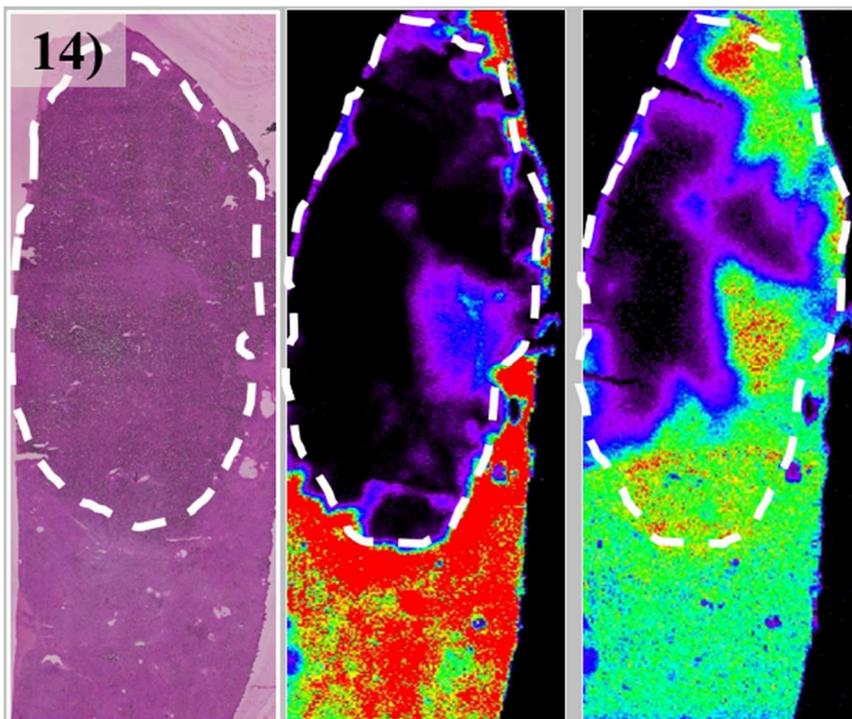
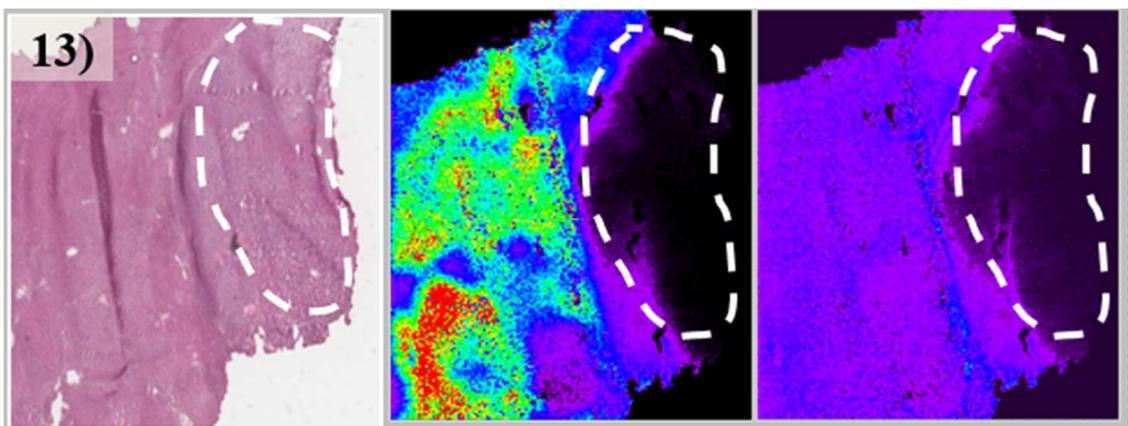
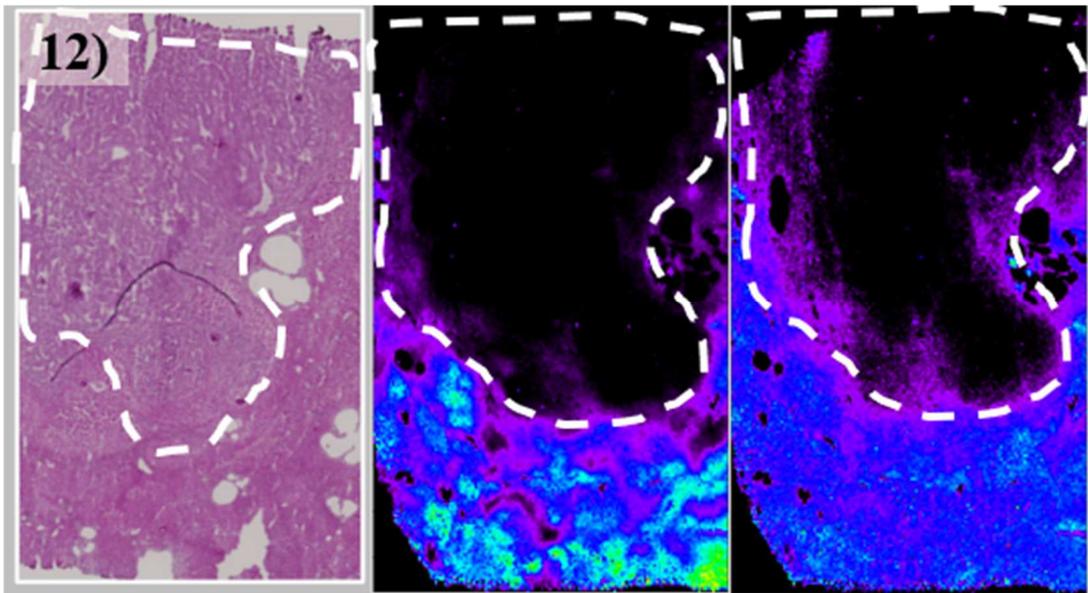
1. Vergrößerte Darstellung der 21 T1-Tumore (links Kryo-HE, mittig Gd, rechts Pt)

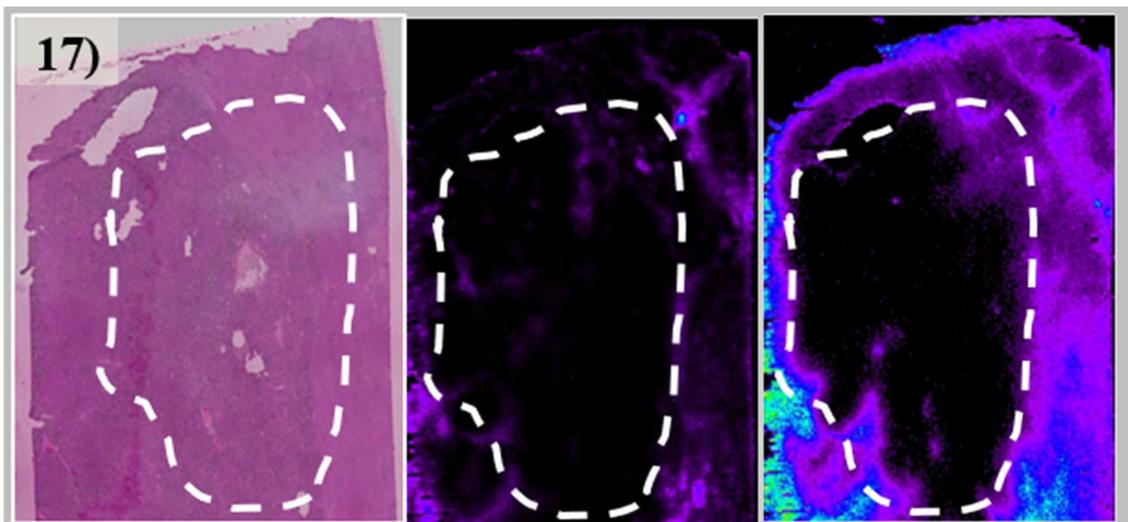
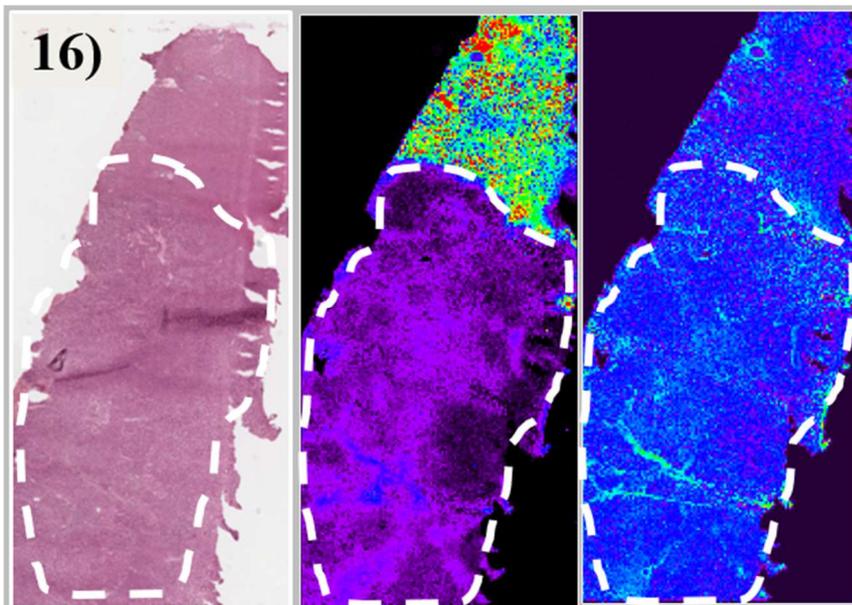
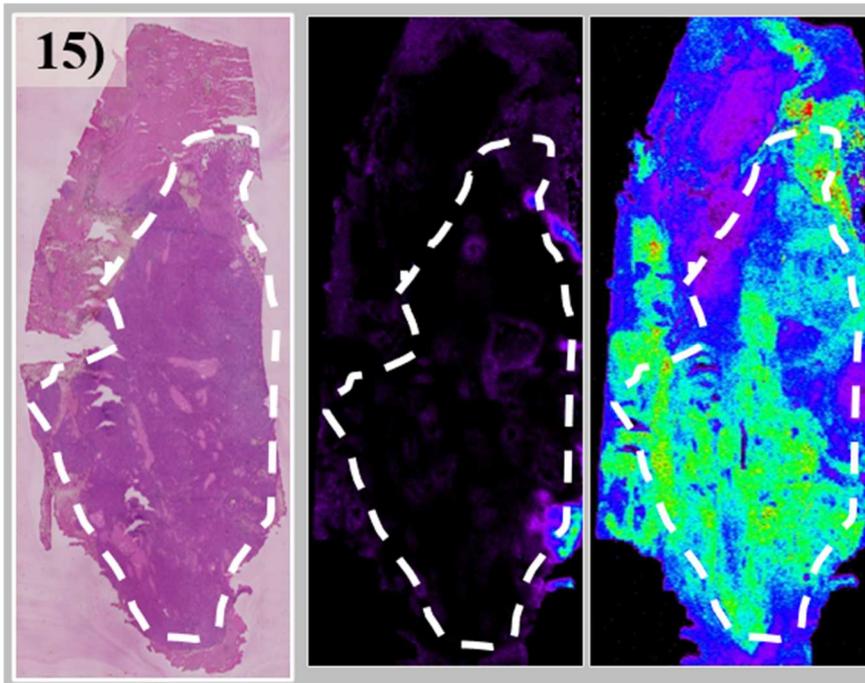


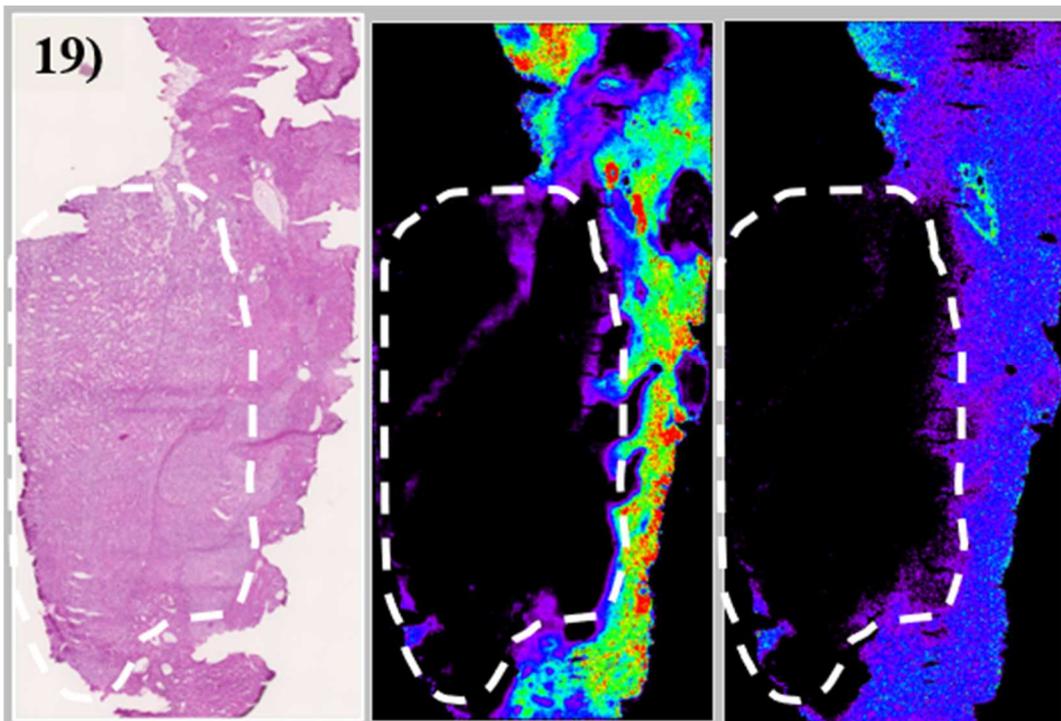
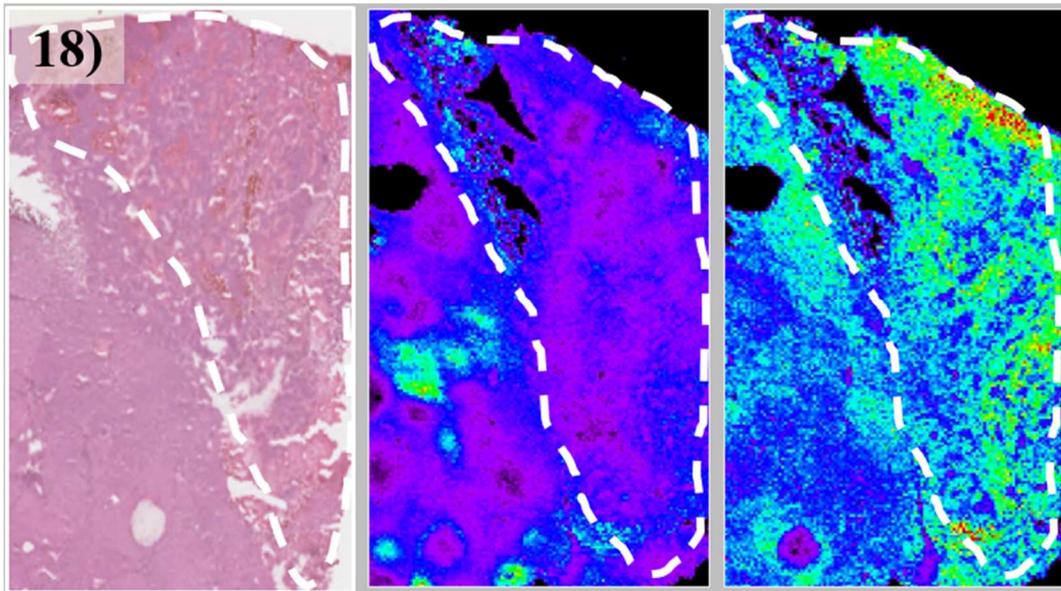


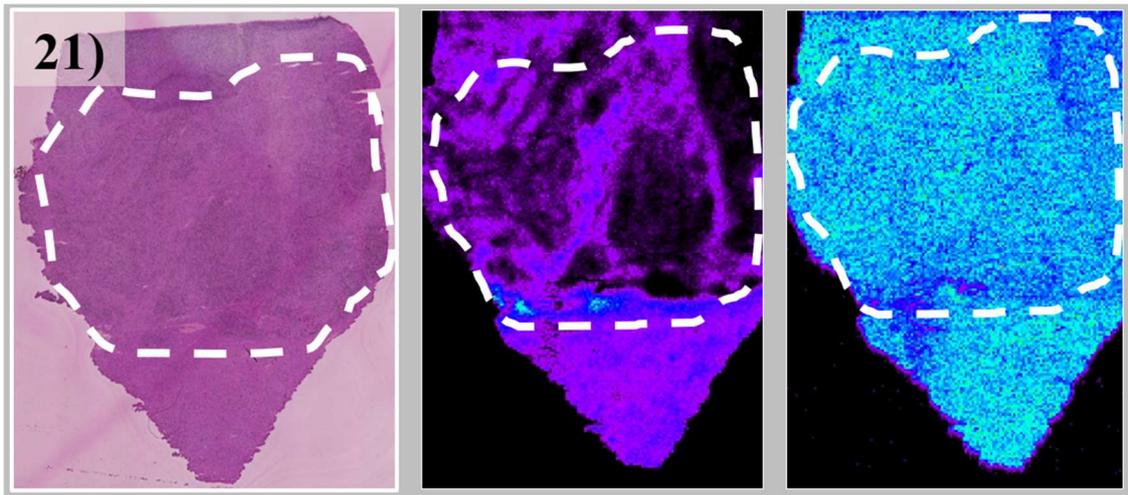
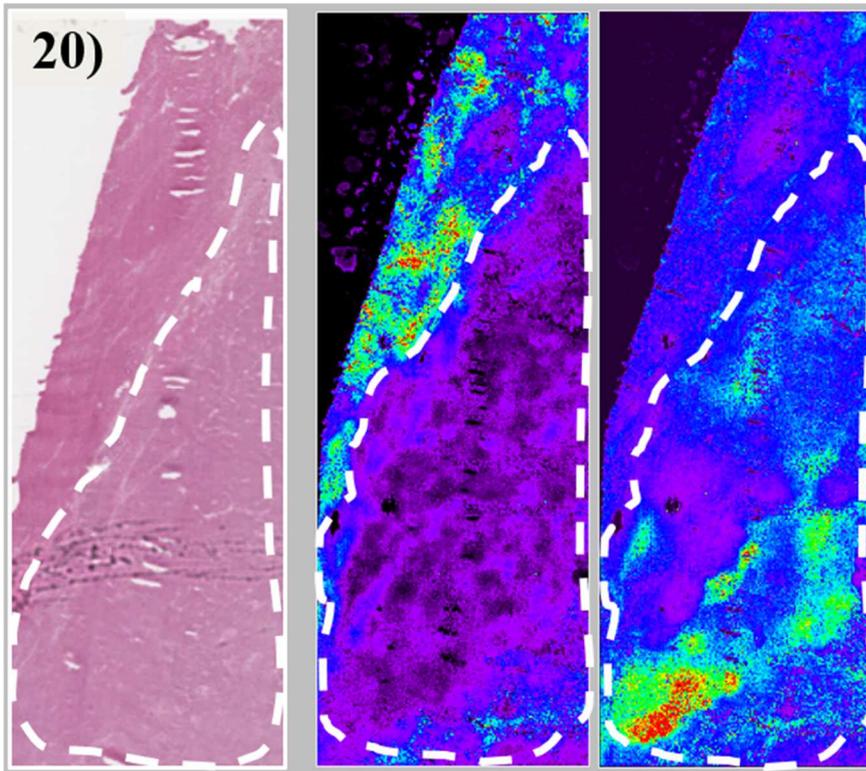












## **XII. DANKSAGUNG**

Abschließend möchte ich mich bei jedem von ganzem Herzen bedanken, der mich im Rahmen dieser Arbeit und bei allem, was darüber hinaus in dieser Zeit passiert ist, begleitet und unterstützt hat.

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Rickmer Braren sowie Herrn PD Dr. med. Fabian Lohöfer für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit zu diesem spannenden, fächerübergreifenden Thema am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Klinikums rechts der Isar der TU München anzufertigen. Fabian danke ich ganz besonders für seine stets ruhige, professionelle und immer hilfreiche Unterstützung. Meinem Mitdoktorand Peter danke ich für die gute Zusammenarbeit während des praktischen Teils dieser Arbeit.

Frau Univ.-Prof. Dr. med. vet. Heidrun Potschka danke ich sehr für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Kollegin Frau Dr. med. vet. Elisabeth Bliemsrieder bedanken. Als meine Vorgängerin hat sie mich nicht nur mit größter Sorgfalt und Geduld in die Thematik eingearbeitet, mich bei der Durchführung angeleitet und meine Fragen jederzeit beantwortet, sondern sie ist darüber hinaus auch zu einer sehr geschätzten Freundin geworden, die mich bis heute begleitet. Nicht nur dein fachlicher, sondern vor allem auch dein mentaler Rat hat mir stets dabei geholfen weiter am Ball zu bleiben.

Unseren Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Uwe Karst, Frau Dr. Rebecca Buchholz und Frau Katharina Kronenberg der WWU Münster danke ich für die gute und konstruktive Zusammenarbeit. Neben der Beantwortung sämtlicher Fragen zum technischen Ablauf habe ich sehr viel über die Massenspektrometrie von dir gelernt Katharina.

Bei Frau PD Dr. med. vet. Katja Steiger sowie ihren Mitarbeiterinnen Frau Dr. med. vet. Hsi-Yu Yen, Frau Olga Seelbach und Frau Marion Mielke bedanke ich mich recht herzlich für die fachliche Beratung und Unterstützung hinsichtlich der pathohistologischen Aufarbeitung, Beurteilung der Proben sowie der Nachforderung von Schnitten und Färbungen. Ebenso gilt mein Dank Frau Petra Hauke sowie meiner ehemaligen Kommilitonin Tanja Groll, die mir beide jederzeit bei Fragen zur Probandigitalisierung oder bei terminlichen Anliegen behilflich waren.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Franz Schilling, Herrn Ph.D. Geoffrey Topping und Herrn Martin Grashei möchte ich aufrichtig für die Etablierung der MRT-Sequenzen sowie deren kompetenter Hilfe bedanken, wenn die Technik mal wieder anders wollte als wir.

Meinen Chefs und Kollegen danke ich sehr für ihr stets offenes Ohr, die Rücksicht bezüglich der Dienstplanung und den praktischen Erfahrungsschatz, den ich parallel zu meiner Schreiarbeit im klinischen tierärztlichen Alltag sammeln konnte. Steffi, Gabi und Katrin danke ich ganz besonders für meine Begleitung ins Berufsleben und die immer wiederkehrenden Nachfragen nach dem Status quo.

Mein großer Dank gilt darüber hinaus meinen Freundinnen Lisa, Laura, Valentina, Mela und Carin, die mich schon seit so vielen Jahren begleiten und mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit immer wieder motiviert haben. Eli, Julia und Steffi danke ich unendlich für das fleißige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Danke Franz für deine unglaubliche Geduld, stetige Unterstützung und unermüdliche Motivation während der vergangenen Jahre. Danke, dass du während dieser nicht immer einfachen Zeit stets an meiner Seite warst und mich immer wieder aufgebaut und aufs Neue motiviert hast.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner gesamten Familie inständig bedanken. Der allergrößte Dank gilt meinen wunderbaren Eltern Edith und Dr. med. Rolf Werner. Euch beiden danke ich aus tiefstem Herzen für alles, was ihr mir je beigebracht und ermöglicht habt. Danke für euren Rückhalt, eure Werte und für euer Interesse an der Medizin, das mich schon mein Leben lang begleitet und immer begleiten wird. Abschließend möchte ich meiner allerliebsten Oma Therese für Ihre lebenslange Unterstützung danken.