

Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen

**Untersuchungen zur Pharmakodynamik von
oxaliplatinhaltigen HIPEC Spülflüssigkeiten ex vivo und
in vitro**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Seyfried, Nick

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Beckert
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. R. Ladurner

Tag der Disputation: 21.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Malignitäten des Peritoneums	1
1.1.1 Peritoneum	1
1.1.2 Hintergrund	1
1.1.3 Pathogenese der peritonealen Metastasierung	2
1.1.4 Erscheinungsbild	3
1.1.5 Diagnostik	3
1.2 Therapie der peritonealen Malignitäten.....	4
1.2.1 Zytoreduktive Chirurgie.....	5
1.2.2 Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie.....	6
1.2.2.1 Pharmakologische Leitidee des lokalen Therapieansatzes	7
1.2.2.2 Leitidee der Hyperthermie	8
1.2.3 Evidenzbasierte Prognose	9
1.2.4 Bedingungen.....	11
1.2.5 Risiken	12
1.2.6 Rezidive	12
1.3 Oxaliplatin in der Therapie peritonealer Malignitäten.....	13
1.3.1 Oxaliplatin	13
1.3.2 Oxaliplatinbasierte HIPEC	15
1.3.2.1 Operationstechnik	15
1.3.2.2 Pharmakologie	15
1.3.2.3 Perfusionslösungen.....	17
1.3.2.4 Kombinierte Verfahren	18
1.3.2.5 Nebenwirkungen	18
1.3.2.6 Studienlage	19
1.4 Wissenschaftliche Fragestellung und Zielsetzung	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Verwendete Materialien	23
2.1.1 Tabellarische Verzeichnisse	23
2.1.2 Zelllinien.....	32
2.1.2.1 OAW42.....	32
2.1.2.2 Caco2.....	33
2.2 Angewandte Methodiken und Auswertungen.....	33
2.2.1 Zellkultur	34

2.2.1.1	Mykoplasmen	34
2.2.1.2	Materialien.....	34
2.2.1.3	Lagerung	35
2.2.1.3.1	Einfrieren.....	35
2.2.1.3.2	Auftauen.....	36
2.2.1.4	Subkultivierung.....	36
2.2.2	RTCA	38
2.2.2.1	Hintergrund	38
2.2.2.2	Grafische Darstellung.....	39
2.2.2.3	Materialien.....	39
2.2.2.4	IPM.....	40
2.2.2.5	Methodik.....	41
2.2.2.5.1	Allgemein	41
2.2.2.5.2	Experiment Tag 1.....	41
2.2.2.5.3	Experiment Tag 2.....	42
2.2.2.5.4	Etablierte Langzeitversuche.....	44
2.2.2.5.5	Wiederverwendung der E-Plate 96	45
2.2.2.6	Auswertung	45
2.2.3	Messung der pH-Werte.....	46
2.2.4	Atomabsorptionsspektroskopie (extern)	46
2.2.5	Durchflusszytometrie	47
2.2.5.1	Hintergrund	47
2.2.5.2	Methodik und Auswertung.....	48
2.2.6	Mikroskopie.....	48
2.2.6.1	Methodik und Auswertung.....	48
2.2.6.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	49
2.2.6.3	Aufnahmen	49
2.2.7	PIT (extern).....	49
2.3	Grafische Darstellungen und veröffentlichte Inhalte	50
3	Ergebnisse	51
3.1	RTCA: ex vivo IPM der Patienten 1-9, HIPEC 30/60 Minuten	51
3.1.1	IPM der Patienten 1-9, HIPEC 30 Minuten	51
3.1.2	IPM der Patienten 1-9, HIPEC 60 Minuten	52
3.1.3	IPM der Patienten 1-9 einzeln, HIPEC 30/60 Minuten.....	54
3.1.3.1	IPM von Patient 1, HIPEC 30/60 Minuten	54
3.1.3.2	IPM von Patient 3, HIPEC 30/60 Minuten	56
3.1.3.3	IPM von Patient 7, HIPEC 30/60 Minuten	58
3.1.3.4	IPM der Patienten 2, 4-6, 8-9, HIPEC 30/60 Minuten	60
3.1.4	IPM der Patienten 3-7, Langzeitversuche.....	66
3.2	RTCA: in vitro hergestellte OCS, HIPEC 30/60 Minuten.....	67
3.2.1	Oxaliplatin in der PDS, HIPEC 30 Minuten	67
3.2.2	Oxaliplatin in der PDS, HIPEC 60 Minuten	68
3.2.3	Oxaliplatin in der PDS, Langzeitversuch	69
3.2.4	Oxaliplatin in der D5W, HIPEC 30 Minuten	70
3.2.5	Oxaliplatin in der D5W, HIPEC 60 Minuten	71
3.2.6	Oxaliplatin in der D5W, Langzeitversuch.....	72

3.2.7	PIT (extern): CTB und SRB, HIPEC 30 Minuten und Langzeitversuch.....	74
3.3	Messung der pH-Werte	76
3.4	AAS (extern): in vitro hergestellte OCS, HIPEC 30/60 Minuten.....	77
3.5	Durchflusszytometrie: OAW42 Zellen, HIPEC 30/60 Minuten	79
3.6	Mikroskopie: Höhe der OAW42 Zellschicht.....	81
3.7	RTCA: Caco2 Zellen, HIPEC 30 Minuten und Langzeitversuche	82
4	Diskussion.....	84
4.1	Methoden	84
4.2	Einordnung der Ergebnisse.....	87
4.3	Einordnung der Studienlage.....	94
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick	99
5	Zusammenfassung	102
6	Literaturverzeichnis.....	104
7	Veröffentlichungen	128
8	Erklärungen zum Eigenanteil	129
9	Danksagung	131

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Eigene Zeichnung des Moleküls Oxaliplatin angelehnt an (Mathe et al. 1989)	14
Abbildung 2: Eigene mikroskopische Aufnahme der OAW42 Zellen	33
Abbildung 3: Eigene Aufnahme der HIPEC Simulation im Inkubationsschüttler	43
Abbildung 4: IPM der Patienten 1-9, HIPEC 30 Minuten.....	51
Abbildung 5: IPM der Patienten 1-9, HIPEC 60 Minuten.....	52
Abbildung 6: IPM von Patient 1, HIPEC 30/60 Minuten	54
Abbildung 7: IPM von Patient 3, HIPEC 30/60 Minuten	56
Abbildung 8: IPM von Patient 7, HIPEC 30/60 Minuten	58
Abbildung 9: IPM von Patient 2, HIPEC 30/60 Minuten	60
Abbildung 10: IPM von Patient 4, HIPEC 30/60 Minuten	61
Abbildung 11: IPM von Patient 5, HIPEC 30/60 Minuten	62
Abbildung 12: IPM von Patient 6, HIPEC 30/60 Minuten	63
Abbildung 13: IPM von Patient 8, HIPEC 30/60 Minuten	64
Abbildung 14: IPM von Patient 9, HIPEC 30/60 Minuten	65
Abbildung 15: Oxaliplatin in der PDS, HIPEC 30 Minuten	67
Abbildung 16: Oxaliplatin in der PDS, HIPEC 60 Minuten	68
Abbildung 17: Oxaliplatin in der PDS, Langzeitversuch.....	69
Abbildung 18: Oxaliplatin in der D5W, HIPEC 30 Minuten.....	70
Abbildung 19: Oxaliplatin in der D5W, HIPEC 60 Minuten.....	71
Abbildung 20: Oxaliplatin in der D5W, Langzeitversuch	72
Abbildung 21: PIT (extern): CTB und SRB, HIPEC 30 Minuten und Langzeitversuch	74
Abbildung 22: AAS (extern): in vitro hergestellte OCS, HIPEC 30/60 Minuten .	77
Abbildung 23: Durchflusszytometrie: OAW42 Zellen, HIPEC 30/60 Minuten....	79
Abbildung 24: Mikroskopie: Höhe der OAW42 Zellschicht.....	81
Abbildung 25: Caco2 Zellen, HIPEC 30 Minuten und Langzeitversuche	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Geräte..... 23
Tabelle 2: Auflistung des Equipments 26
Tabelle 3: Auflistung der elektronischen 96-Well-Platten..... 29
Tabelle 4: Auflistung der Materialien 30
Tabelle 5: Inhaltsangaben von der D5W und PDS..... 31
Tabelle 6: Auflistung der Auswertungs- bzw. Softwareprogramme..... 32
Tabelle 7: IPM der Patienten 3-7, Langzeitversuche (erste Zeitangabe
CI_n < 0,5) 66
Tabelle 8: Messung der pH-Werte 76

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AVT	Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie Tübingen
CCR	Vollständigkeit der Zytoreduktion
CI	Zellindex
CI _n	Normierter Zellindex
CRC	Kolorektales Karzinom
CRS	Zytoreduktive Chirurgie
CTB	CellTiter Blue
DACH-Ligand	1,2-Diaminocyclohexan-Ligand
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
D5W	Glucosteril 5 % Infusionslösung
FKS	Fetales Kälberserum
FSC-A	Vorwärtsstreulicht-Bereich
HIPEC	Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
IPM	Intraoperativ entnommenes Patientenmaterial
MEM	Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10 % fetales Kälberserum und 1 % Penicillin-Streptomycin)
OCS	Oxaliplatinhaltige Spülflüssigkeit
PCI	Peritoneal Cancer Index
PDS	Peritonealdialyselösung PHYSIONEAL 40 Glucose 2,27 % w/v / 22,7 mg/ml
PIT	Physiologisches Institut des Universitätsklinikums Tübingen
PM	Peritoneale Metastasen
RTCA	Echtzeit-Methode der impedanzbasierten Zellanalytik (Real-Time Cell Analysis)
SRB	Sulforhodamin B
ZKF	Zellkulturflasche

1 Einleitung

1.1 Malignitäten des Peritoneums

Eine Krebserkrankung ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen und wird in naher Zukunft mit einer zunehmenden Prävalenz vergesellschaftet sein (Sung et al. 2021). Auch das Bauchfell kann betroffen sein und einen Tumorbefall aufweisen.

1.1.1 Peritoneum

Das Peritoneum kleidet als die größte seröse Membran des menschlichen Körpers topografisch die Bauchhöhle und Teile des Beckens aus (van Baal et al. 2017). Es unterteilt sich in ein die Organe überziehendes, viszerales sowie ein die Bauchwand bedeckendes und schmerzempfindliches, parietales Blatt (van Baal et al. 2017). Dazwischen befindet sich physiologisch ein mit mehreren Millimetern Flüssigkeit gefüllter Spaltraum (van Baal et al. 2017). Die als Mesenterium bezeichneten Peritonealduplikaturen dienen als Halteapparat der Bauchorgane und als Leitstruktur für die Versorgung mit Gefäßen und Nerven (van Baal et al. 2017). Das Bauchfell selbst ist dreiteilig aufgebaut und besteht aus einer einlagigen Gewebeschicht aus Mesothelzellen, einer Basalmembran sowie einem submesothelialen Stroma (van Baal et al. 2017).

Dem Peritoneum liegt eine komplexe Funktionalität als physiologische Barriere zugrunde, bei welcher insbesondere der endothelialen Glykokalyx eine entscheidende Bedeutung beigemessen wird (Flessner 2005; Flessner 2008). Darüber hinaus weist das Bauchfell primär immunologische und regulatorische Eigenschaften auf (Isaza-Restrepo et al. 2018). Zu den weiteren Aufgaben zählen v. a. die Förderung der Wundheilung sowie die ermöglichte Verschiebbarkeit der intraperitoneal gelegenen Organe zueinander (Isaza-Restrepo et al. 2018).

1.1.2 Hintergrund

Der Befall mit Tumorzellen kann entweder vom Peritoneum selbst ausgehen oder weitaus häufiger als Folge der Metastasierung eines fortgeschrittenen Primärtumors auftreten. Bei Letzterem liegt der Ursprung der malignen Entartung

hauptsächlich in gynäkologischen und gastrointestinalen Tumorerkrankungen: peritoneale Metastasen (PM) treten bspw. in rund 8 % beim kolorektalen Karzinom (CRC) und in 14 % bei gastralen Tumoren auf (Segelman et al. 2012; Thomassen et al. 2014a). Aufgrund der anatomischen Lage nimmt das Ovarialkarzinom eine besondere Rolle ein. Bereits 1927 wurde der Fall einer metastatischen Beteiligung des Peritoneums beim Eierstockkrebs beschrieben und 4 Jahre später durch den Begriff der „*peritoneal carcinomatosis*“ von Sampson geprägt (Sampson 1931; Whitehouse 1927). Ebenfalls werden bei Tumorentitäten außerhalb der Bauchhöhle PM in 9 % beobachtet, und zwar ursächlich in absteigender Reihenfolge beim Brustkrebs, Lungenkarzinom und dem malignen Melanom (Flanagan et al. 2018). Bleibt die Lokalisation des Primärtumors im Allgemeinen unbekannt, ist ein maligner Befall des Peritoneums in rund jedem 9. Fall zu verzeichnen (Thomassen et al. 2014b).

Im Gegensatz zu der peritonealen Aussaat von sekundären Malignomen kann in selteneren Fällen eine Peritonealkarzinose direkt vom Bauchfell ausgehen. Hierzu werden wiederum das primär peritoneale Karzinom oder das Mesotheliom gezählt (Ilfthikar et al. 2014; Kim et al. 2017). Für die klinische Diagnose der ebenfalls zugehörigen Tumorentität des Pseudomyxoms ist eine ausgeprägte Schleimbildung charakteristisch, dessen typische Ätiologie die rupturierte muzinöse Appendixneoplasie ist (Mittal et al. 2017).

Bei den peritonealen Malignitäten zeigten Daten aus den Vereinigten Staaten von Amerika von 2001-2014 eine stagnierende Inzidenz pro 100000 Frauen mit einem Altersgipfel von 75-79 Jahren (Liao et al. 2018).

1.1.3 Pathogenese der peritonealen Metastasierung

Neben einer direkten Infiltration des Primärtumors per continuitatem stehen verschiedene Annahmen über den Mechanismus der peritonealen Dissemination zur Diskussion, die auf ein multifaktorielles Geschehen zurückgehen. Demgemäß werden zelluläre und molekulare Wechselwirkungen sowie die damit einhergehende Seed-and-Soil Theorie von Paget erwogen (Mikula-Pietrasik et al. 2018; Paget 1989). Beim CRC wird dabei eine Ablösung freier Tumorzellen vom Primärtumor angenommen, welche nach Ausbreitung in der

Abdominalhöhle über die Kaskade bestimmter Mediatoren bzw. Signalwege als Implantationsmetastasen an das Mesothel adhären (Ceelen and Bracke 2009). Die darauffolgende Invasion des Gewebes initiiert schließlich das Tumorstadium und die Angiogenese (Lemoine et al. 2016). Darüber hinaus erfolgt die peritoneale Dissemination hämatogen und lymphogen, während auch eine Verteilung über die Peritonealflüssigkeit befürchtet werden muss (Carmignani et al. 2003; Ceelen and Bracke 2009; Lemoine et al. 2016). Weiterhin darf eine Verbreitung durch die chirurgische Intervention selbst nicht vernachlässigt werden (Sugarbaker 1999).

1.1.4 Erscheinungsbild

Die Morphologie dieser Erkrankung manifestiert sich typischerweise in wenigen Millimeter großen und multipel auftretenden Tumorknoten und -platten (Hanbidge et al. 2003). Die peritoneale Aussaat kann dabei entweder diffus verstreut vorliegen oder lokal umschriebene Regionen betreffen, bevorzugt nach der Zirkulation bzw. dem Gradienten der peritonealen Flüssigkeit (Meyers 1973).

Das klinische Erscheinungsbild bei Malignitäten des Bauchfells ist meist unspezifisch. Die Patienten klagen oftmals über Kachexie, Müdigkeit, Nausea sowie über Schmerzen im Abdomen (Lambert and Wiseman 2018). Mit fortgeschrittenem Stadium können weitere funktionelle Beeinträchtigungen wie ein Darmverschluss oder ein Harnverhalt als Begleiterscheinungen hinzukommen (Lambert and Wiseman 2018). Ebenso beobachtet man charakteristischerweise eine Umfangsvermehrung durch malignen Aszites (Lambert and Wiseman 2018). Die pathologische Flüssigkeitsansammlung gilt als negativer prädiktiver Faktor (Sadeghi et al. 2000).

1.1.5 Diagnostik

Präoperativ kann die nichtinvasive Einschätzung des Erkrankungsgrads mit der kontrastmittelgestützten Computertomografie erfolgen (Marin et al. 2010; Yan et al. 2008). Für eine adäquate Aussagefähigkeit lässt sich diese radiologische Untersuchung mithilfe der Positronenemissionstomografie als Fusionsbildgebung komplementieren (Pfannenberget al. 2009). Alternativ steht die

(diffusionsgewichtete) Magnetresonanztomografie als sensitiveres Verfahren in der bildgebenden Diagnostik zur Verfügung (van 't Sant et al. 2020). Daneben finden zum Staging eine histologische Beurteilung sowie eine Evaluation der Tumorlast statt (Jacquet and Sugarbaker 1996a). Nichtsdestotrotz werden peritoneale Malignitäten vielfach erst bei der operativen Intervention des Primärkarzinoms entdeckt. Die Problematik liegt u. a. darin begründet, dass sich gerade kleine Tumorumfänge sowie kritische Regionen des Abdomens, wie das Dünndarmsegment, radiologisch nicht sicher abbilden lassen (Jacquet et al. 1993; Marin et al. 2010). Somit korreliert mitunter der intraperitoneale Befall nicht mit dem Befund der Bildgebung (Koh et al. 2009). Um das Ausmaß abschließend beurteilen zu können, wird aus diesem Grund bei selektierten Patienten die präoperative Laparoskopie bevorzugt (Iversen et al. 2013). Eine bei der diagnostischen Exploration ebenfalls vorgenommene Spülzytologie kann weitere wichtige Aussagen liefern (Ikoma et al. 2016).

1.2 Therapie der peritonealen Malignitäten

PM werden als ein ernstes und weit fortgeschrittenes Krankheitsbild mit einer limitierten Lebensqualität und hohen Mortalität angesehen. Gemäß den Ergebnissen von Studien weist seinerzeit eine peritoneale Beteiligung von gastrointestinalen Malignitäten erheblich reduzierte Überlebensraten von wenigen Monaten auf (Chu et al. 1989; Sadeghi et al. 2000).

In der Vergangenheit standen für dieses terminale Tumorstadium nur eingeschränkte bzw. palliative Behandlungsoptionen mit unterstützenden Maßnahmen zur Verfügung (Lambert 2015). Mit einer systemischen Chemotherapie ist bei PM des CRC ein medianes Überleben von etwas über 8 Monaten erreicht worden (Klaver et al. 2011). Eine chirurgische Intervention wird im Falle von tumorbedingten Komplikationen wie Darmobstruktionen durchgeführt (Lambert 2015). Insgesamt stellten daher einst peritoneale Malignitäten eine früh zum Tode verlaufende Erkrankung mit deutlich begrenzten Präventions- und Therapiemöglichkeiten dar (Lambert 2015).

1.2.1 Zytoreduktive Chirurgie

In den letzten Jahrzehnten etablierte sich ein multimodales Therapiekonzept mit der Hauptkomponente eines chirurgischen Ansatzes, die sogenannte zytoreduktive Chirurgie (CRS) (Sugarbaker 1989). Es ist der Pionierarbeit von Sugarbaker zu verdanken, der diese mehrstündige Operation eingeführt hat. Die CRS zielt darauf ab, alle makroskopisch erfassbaren Tumoranteile vollständig chirurgisch zu entfernen (Sugarbaker 1995). Damit beinhaltet diese radikale Therapieform eine parietale und viszerale Peritonektomie inklusive einer simultanen Resektion der intraabdominal befallenen Organe (Sugarbaker 1995).

Anhand des ebenfalls durch den Wegbereiter Sugarbaker entwickelten „*Peritoneal Cancer Index*“ (PCI) erfolgt zunächst die subjektive Einschätzung des Ausmaßes des vorhandenen peritonealen Tumorbefalls durch den Operateur (Sugarbaker 1999). Für den Verteilungsgrad ist das Abdomen in insgesamt 13 Regionen (9 Abschnitte für die Bauchhöhle und 4 Segmente für den Dünndarm) untergliedert worden (Sugarbaker 1999). Nach einer ausführlichen Exploration wird das Tumolvolumen nach jeweiliger Größe mit einem Score von 0-3 quantifiziert (Sugarbaker 1999). Hieraus addiert sich gesamt ein PCI zwischen 0 (kein Tumor) und 39 (höchstmöglicher Befall) (Sugarbaker 1999). Die maximal erreichte Vollständigkeit der Zytoreduktion (CCR) wird mittels eines weiteren Scores angegeben und ist bestenfalls gleich 0 (Tumorfreiheit) (Sugarbaker 1999). Angestrebt ist ein postoperativer Resektionsstatus der kompletten oder zumindest annähernd vollständigen radikalen CRS, welcher entweder die gesamte Entfernung des Tumors (CCR-0) gewährleistet oder bei der ein kumulativer Resttumor die Größe von 2,5 mm (CCR-1) nicht überschreitet (Sugarbaker 1999).

Sowohl der PCI als auch die CCR korrelieren streng mit der Überlebensrate (Hallam et al. 2019). Diese hängt nicht nur von der Ausdehnung der betroffenen Areale ab, sondern auch von der jeweils beteiligten peritonealen Lokalisation (Spiliotis et al. 2015b). Da der Erfolg der CRS maßgeblich durch das Ausmaß der peritonealen Malignität bestimmt ist, werden für diese Therapieform primär Patienten mit einer limitierten Tumorausdehnung in Betracht gezogen. Für die unterschiedlichen Tumorentitäten ist dabei ein bestimmter Schwellenwert für die

Indikationsstellung vorgeschlagen worden. Der Nutzen wird bspw. beim CRC mit einem PCI über 15-17 als prognostisch nicht Vorteil bringend erachtet (Elias et al. 2014; Goere et al. 2015). Beim aggressiven Magenkarzinom lässt sich die Grenze des PCI bei 12 ziehen (Coccolini et al. 2015). Dementgegen können beim Pseudomyxom deutlich höhere Werte toleriert werden (Glehen and Gilly 2003). Selbst für einen maximalen PCI von 39 lassen sich wiederum bei Appendixtumoren noch mitunter zielführende Ergebnisse erreichen, allerdings unter der Berücksichtigung einer ausgeprägten Morbiditätsrate (Sarkar et al. 2021).

Neben weiteren Klassifikationen für den peritonealen Tumorbefall stellt eine Einteilung das eingeführte „*Lyon staging system*“ nach Gilly et al. dar (Gilly et al. 1994; Gilly et al. 2006). Auch hier besteht eine negative Korrelation zwischen der Höhe des Stadiums und der mittleren Überlebensrate (Sadeghi et al. 2000).

1.2.2 Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie

Dunlap und Bull haben ein thermisches Infusions-Filtrationssystem entwickelt, welches eine intrakavitäre Anwendung erlaubte (Spratt et al. 1980b). Diese Verabreichungsform wurde 1980 von Spratt et al. modifiziert, um erstmals die Behandlung einer intraperitonealen Chemotherapie in Kombination mit Wärme zu ermöglichen (Spratt et al. 1980b). Im Anschluss an die chirurgische Resektion wurde die als sicher und verträglich beschriebene Therapieoption an einem Patienten mit peritonealer Beteiligung eines Pseudomyxoms angewandt (Spratt et al. 1980a). Dieses Konzept wurde von Sugarbaker prägend weiterentwickelt und etablierte sich als sogenannte HIPEC. HIPEC ist ein Akronym und steht für die Abkürzung hypertherme intraperitoneale Chemotherapie (Gonzalez-Moreno 2006). Das Prinzip dieser Methodik zielt darauf ab, nach der CRS mikroskopisch verbliebene Karzinomherde und freie maligne Zellen zu eliminieren (Sugarbaker 1989). Dadurch soll die lokale Tumorkontrolle sichergestellt und einer Rekurrenz der Erkrankung vorgebeugt werden (Sugarbaker 1998).

In der Regel werden mehrere Liter einer ausgewählten Perfusionslösung über ein geschlossenes Kathetersystem in den Bauchraum verabreicht (Sugarbaker 1999). Dabei sorgen eine spezielle Pumpe sowie ein Wärmergerät für eine konstante Zirkulation und eine Erhitzung über die physiologische Körpertemperatur

hinaus (Sugarbaker 1999). Nach Zugabe des jeweiligen Zytostatikums dauert die Spülung des Abdomens je nach verwendetem Protokoll 30-120 Minuten (Yurttas et al. 2018). Im Grundsatz existieren für die operative Durchführung der HIPEC die beiden verschiedenen Verfahren der offenen gegenüber der geschlossenen Technik des Abdomens (Sugarbaker and Van der Speeten 2016). Bei der Anwendung der offenen Variante bedient man sich der manuellen Verteilung der erwärmten Lösung mit dem Chemotherapeutikum (Sugarbaker and Van der Speeten 2016). Dadurch soll der Vorteil einer homogenen Verteilung bzw. einer Sicherstellung der gleichmäßigen Exposition auf der Oberfläche der Tumorregion gegeben sein (Sugarbaker and Van der Speeten 2016). Gegenteilig verhält es sich wiederum mit der geschlossenen Methodik, bei der u. a. ein erhöhter Schutz vor dem Austritt des Zytostatikums besteht sowie einem Hitzeverlust während der HIPEC Behandlung vorgebeugt werden kann (Esquivel 2009).

Unterdessen werden minimalinvasive Ansätze einer laparoskopischen CRS plus HIPEC selektiv als möglich erachtet (Arjona-Sanchez et al. 2021).

1.2.2.1 Pharmakologische Leitidee des lokalen Therapieansatzes

Für die Grundannahme der HIPEC als regionale Therapieform ist der Begriff der Peritoneum-Plasma-Schranke anzuführen, welche von Signifikanz für die Pharmakokinetik der verabreichten Chemotherapeutika ist (Jacquet and Sugarbaker 1996b; Sugarbaker et al. 1996). Diese physiologische Barriere bezweckt dabei eine limitierende intraperitoneale Clearance des Wirkstoffs, wodurch die erhöhte lokale Exposition eine Maximierung der Konzentration und damit der Zytotoxizität erreicht (Hasovits and Clarke 2012; Jacquet and Sugarbaker 1996b). Anhand der Beispiele von Carboplatin und Cisplatin ist dies anschaulich belegt worden (Elferink et al. 1988; Howell et al. 1982; Miyagi et al. 2005). Für Cisplatin wurde im Modellorganismus ebenfalls dargelegt, dass durch die intraperitoneale Gabe eine höhere Konzentration insbesondere im peripheren Tumorgewebe erzielt werden kann (Los et al. 1989). Neben dem Vorteil eines direkten Oberflächenkontakts mit der peritonealen Malignität scheinen ferner auch gering vaskularisierte Tumore vermehrt von dieser lokalen Applikation zu

profitieren als von einer intravenösen Therapie (Hasovits and Clarke 2012; Winner et al. 2016).

Ergänzend zielt die Vorstellung der HIPEC darauf ab, die systemische Exposition durch eine direkte intraperitoneale Verabreichung möglichst zu vermeiden und dadurch das Risiko einer potenziellen Toxizität außerhalb des Bauchraums zu verringern (Hasovits and Clarke 2012). Für 5-Fluorouracil ist bewiesen worden, dass bei einer direkten abdominalen Applikation höhere Dosierungen toleriert werden, ohne gleichzeitig die Nebenwirkungen zu verstärken (Sugarbaker et al. 1985). Im Tiermodell wurde weiter belegt, dass die systemische Absorption nicht nur von dem jeweiligen Molekulargewicht beeinflusst wird, sondern ebenfalls von der Ionisierung und der Lipidlöslichkeit (Torres et al. 1978).

Nichtsdestotrotz muss auch die Einflussnahme des verabreichten HIPEC Volumens auf die Pharmakokinetik des intraperitoneal applizierten Chemotherapeutikums beachtet werden, wohingegen eine chirurgische Resektion des parietalen Peritoneums keinen Effekt hierauf hat (de Lima Vazquez et al. 2003; Sugarbaker et al. 2006).

1.2.2.2 Leitidee der Hyperthermie

Vor dem Hintergrund von nachgewiesenen Effekten durch eine Temperaturerhöhung können maligne Zellen eine selektive Hitzesensitivität aufzeigen (Dickson and Calderwood 1980). Wie anhand von CRC Zellkulturen gezeigt wurde, verursacht die Erwärmung per se eine Tumoreliminierung (Helderman et al. 2020). Neben dieser direkten Zytotoxizität stehen weitere Wirkungsweisen im Zusammenhang mit einer Hyperthermie: die Beeinträchtigung von DNA-Reparaturmechanismen, die Induktion von Hitzeschockproteinen, die Stimulation immunologischer Prozesse sowie die Erhöhung der Durchblutung und der Fließfähigkeit der Zellmembranen (van den Tempel et al. 2016). Aufgrund dieser Faktoren wurde bereits 1980 über die Vorteile einer intraperitonealer Hyperthermie bei PM im Tiermodell berichtet (Shiu and Fortner 1980).

Die maßgebliche Beeinflussung des Zellstoffwechsels durch eine erhöhte Temperatur hat auch eine Änderung der Pharmakokinetik zur Folge. In Verbindung mit einer gesteigerten Gewebepfusion resultiert die vermehrte

Membrandurchlässigkeit vermutlich in einer verbesserten Aufnahme des Wirkstoffs (van den Tempel et al. 2016). Überdies ist seit mehreren Jahrzehnten bekannt, dass eine mäßige Hyperthermie eine pharmakologische Verstärkung der zytotoxischen Aktivität von Chemotherapeutika bewirken kann (Urano et al. 1999). Für die beiden häufig verwendeten Substanzen Mitomycin C und Cisplatin ist schon früh in vitro an CRC Zellen eine additive Wirksamkeit durch Wärme und damit ein synergetischer Effekt beschrieben worden (Barlogie et al. 1980). Insbesondere eine Temperatur von über 40 °C wurde als potenziell kritischer Schwellenwert ermittelt (Schaaf et al. 2015).

Obwohl die Eindringtiefe der meisten Chemotherapeutika bei einer intraperitonealen Gabe im Gewebe auf wenige Millimeter begrenzt ist, kann im Zusammenhang mit einer Erwärmung eine erhöhte Penetration bzw. Konzentration erreicht werden (El-Kareh and Secomb 2004; Los et al. 1991). Gleichzeitig wird der im Tumorgewebe gesteigerte interstitielle Flüssigkeitsdruck, der das Therapieansprechen negativ beeinflussen kann, durch die Hyperthermie verringert (Heldin et al. 2004; Leunig et al. 1992; Sen et al. 2011).

1.2.3 Evidenzbasierte Prognose

Gegenwärtig ist das Behandlungsprinzip aus CRS und HIPEC weltweit übernommen worden. Das generelle Bestreben dieser Therapie liegt darin, ein Langzeitüberleben zu ermöglichen (Glehen et al. 2010b; Kyang et al. 2019; Levine et al. 2014). Je nach Tumorentität besteht selektiv für Patienten ein kuratives Potenzial (Goere et al. 2013).

Eine Verlängerung der medianen Gesamtüberlebensrate ist für das Magenkarzinom beschrieben worden (Desiderio et al. 2017; Glehen et al. 2010a; Rau et al. 2020; Rihuete Caro et al. 2018). Ebenfalls trifft dies für die primär vom Peritoneum ausgehenden Malignitäten wie das Mesotheliom oder das Pseudomyxom zu (Chua et al. 2012; Kyang et al. 2019; Smeenk et al. 2007; Sugarbaker et al. 2016). Bei Entartungen der Appendix mit einer peritonealen Dissemination konnte nach der vollständigen CRS und HIPEC eine 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 86 % erreicht werden (Sugarbaker and Chang 1999). Ebenso erreicht der multimodale Ansatz bei der Therapie des fortgeschrittenen

Ovarialkarzinoms prognostisch einen medianen Überlebensvorteil (Chua et al. 2009; Zhang et al. 2019). Der operativen Vorgehensweise aus CRS plus HIPEC kommt hier v. a. in der Rezidivsituation eine tragende Rolle zu, bei der einer Chemosensitivität keine Relevanz zugesprochen werden kann (Bakrin et al. 2013; Spiliotis et al. 2015a). Weiterhin ist mit diesem Behandlungskonzept durchschnittlich eine Verlängerung des Langzeitüberlebens in der Therapie von PM des CRC erreicht worden (Flood et al. 2020; Huang et al. 2017). Eine randomisiert kontrollierte Phase-III-Studie von Verwaal et al. konnte bei selektierten Patienten belegen, dass die Einführung der chirurgischen Vorgehensweise in Kombination mit einer HIPEC (90 Minuten mit Mitomycin C bei 40 °C) nahezu eine Verdoppelung der Gesamtüberlebensrate im Vergleich zu einer alleinigen systemischen Chemotherapie (Fluorouracil-Leucovorin) erzielt (Verwaal et al. 2003). Auch in der Verlaufskontrolle nach 8 Jahren konnte die prospektive Untersuchung ihre Ergebnisse erneut bestätigen (Verwaal et al. 2008). Aufgrund dieses Langzeitüberlebens wurde bei einer entsprechenden Indikationsstellung diese Therapieform als mögliche Behandlungsoption gesehen. Aktuell ist die CRS plus HIPEC Bestandteil der S3-Leitlinie CRC, die unter bestimmten Voraussetzungen durchgeführt werden kann (Empfehlungsgrad 0) (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF) 2019).

Da der Stellenwert der einzelnen Behandlungselemente per se ungeklärt blieb, prüfte eine niederländische Phase-III-Studie unter van Driel et al. den Aspekt, ob die Ergänzung einer HIPEC der alleinigen CRS überlegen ist (van Driel et al. 2018). Dabei wurde multizentrisch eine Gesamtzahl von 245 Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom randomisiert eingeschlossen (van Driel et al. 2018). Es handelte sich hierbei um eine selektierte Patientengruppe, welche eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten hat (van Driel et al. 2018). Die Resultate zeigten, dass der Zusatz einer intraperitonealen Chemotherapie (90 Minuten mit Cisplatin bei 40 °C) zu einem längeren medianen Gesamtüberleben (45,7 Monate gegenüber 33,9 Monate) sowie rezidivfreien Intervall (14,2 Monate gegenüber 10,7 Monate) im Vergleich zu der alleinigen CRS führte (van Driel et al. 2018). Überdies konnten dem HIPEC Verfahren keine vermehrten Nebenwirkungen Grad III/IV zugeschrieben werden (van Driel et al. 2018).

Auch in weiteren Studien hat sich in diesem Zusammenhang ein etwaiger Vorteil der HIPEC herausgestellt (Bonnot et al. 2019; Wang et al. 2019). Dennoch bleibt der additive Nutzen aufgrund der bislang limitierten Studienlage strittig und ihre uneingeschränkte Relevanz steht weiterhin zur Diskussion aus (Chiva and Gonzalez-Martin 2015; Desolneux et al. 2015; Eveno and Pocard 2016).

1.2.4 Bedingungen

Für die Indikationsstellung dieser Therapiemethode steht zunächst eine adäquate Patientenselektion im Vordergrund (Simkens et al. 2017; Sugarbaker 1999). Die CRS plus HIPEC ist generell nicht für Patienten in einem reduzierten Allgemeinzustand geeignet (Piso et al. 2009). Aufgrund des invasiven Eingriffs müssen ferner eine kardiovaskuläre Stabilität und eine angemessene Lungen- und Nierenfunktion berücksichtigt werden (Piso et al. 2009). Ein höheres Lebensalter stellt an sich keinen Ausschlussgrund dar, wobei hier mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität zu rechnen ist (Gagniere et al. 2018).

Weitere entscheidende Kriterien betreffen die Malignität selbst, was den histologischen Status mit dem jeweiligem Differenzierungsgrad einschließt (Kwakman et al. 2016). Darüber hinaus eignet sich dieses multimodale Behandlungskonzept nicht für alle Tumorentitäten mit einer peritonealen Aussaat gleichermaßen. Der Stellenwert dieser Therapie ist bspw. bei weit fortgeschrittenen und prognostisch ungünstigen Erkrankungen wie dem Pankreaskarzinom unbestimmt (Brind'Amour et al. 2021). Damit einhergehend sind limitierende Faktoren die Lokalisation und das Ausmaß der Erkrankung (Piso et al. 2009). Eine komplette Resektion ist u. a. bei einer obstruktiven Infiltration der Gallenwege oder der Harnleiter, einer diffusen Ausdehnung auf die Mesenterialwurzel des Dünndarms sowie bei Lebermetastasen eingeschränkt bis nicht möglich (Esquivel et al. 2007). Zudem dürfen keine Tumormanifestationen außerhalb des Abdomens vorliegen (Esquivel et al. 2007). Die Entscheidung der Nutzen-Risiko-Abwägung sollte immer individuell und in einer interdisziplinären Tumorkonferenz eruiert werden.

1.2.5 Risiken

Grundsätzlich ist die CRS plus HIPEC ein umfangreiches und komplexes Therapiekonzept, welches ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil und eine nicht zu vernachlässigende Komplikationsrate aufweisen kann. Vor dem Hintergrund einer sich entwickelnden Lernkurve bez. einer Verbesserung der chirurgischen Intervention sollte die Behandlung ausschließlich an spezialisierten Zentren mit einem multidisziplinären Team durchgeführt werden (Kuijpers et al. 2016; Kusamura et al. 2013). Auf dieser Expertise beruhend, wird die CRS und HIPEC mittlerweile als sicheres Operationsverfahren angesehen (Horvath et al. 2021; Piso et al. 2019). Insgesamt sind dabei die Verhältnisse mit denen anderer onkologischer Hochrisikoeingriffe vergleichbar und hinsichtlich des sich ergebenden Überlebensvorteils entsprechend vertretbar (Foster et al. 2019).

Demgemäß konnte die Mortalität im Mittel auf unter 3 % gesenkt werden (Foster et al. 2019; Macri et al. 2020; Piso et al. 2019). Ungeachtet davon werden für dieses multimodale Therapieverfahren mit durchschnittlich rund 19-31 % relativ hohe Morbiditätsraten Grad III/IV beschrieben (Macri et al. 2020; Piso et al. 2019). Hierbei werden hauptsächlich die folgenden Komplikationen umfasst: Insuffizienzen der Anastomosen, Darmverschlüsse, Fisteln, Pankreatitiden oder Infektionen bis hin zu einer Sepsis (Macri et al. 2020; Piso et al. 2019). Neben den lokalen Risiken dürfen auch eine Hämato- und Nephrotoxizität sowie Thrombosen nicht ungenannt bleiben (Macri et al. 2020; Piso et al. 2019). Aus diesen Komplikationen folgen u. U. langwierige Hospitalisierungen bzw. Liegezeiten auf der Intensivstation (Levine et al. 2014; Macri et al. 2020; Piso et al. 2019). Folglich wird durch die invasive Behandlung zunächst postoperativ eine allgemeine Verschlechterung des Wohlbefindens des Patienten verzeichnet, wobei langfristig mit dem Erhalt oder einem Zugewinn an Lebensqualität gerechnet werden kann (Seretis and Youssef 2014).

1.2.6 Rezidive

Trotz der kombinierten Behandlungsmethodik aus CRS plus HIPEC wird häufig ein prognostisch ungünstiges Wiederauftreten der Erkrankung beobachtet (Tan et al. 2018; van Oudheusden et al. 2015b). Es ist in Studien festgestellt worden,

dass sich nach dieser Therapie bei ca. 65 % der Patienten mit PM des CRC Tumorrezidive entwickeln können (Feferman et al. 2019; Verwaal et al. 2004). Als einen unabhängigen Risikofaktor hierfür lässt sich eine hochgradige Histologie der Malignität anführen (Konigsrainer et al. 2013).

Durch entsprechende Nachsorgeuntersuchungen in einem festgelegten Intervall wird versucht etwaige Rezidive frühzeitig zu identifizieren. Andernfalls kann eine Wiederholung der multimodalen Behandlung bei ausgewählten Patienten in Betracht gezogen werden (Bekhor et al. 2020; Laks et al. 2021; Sutton et al. 2021).

1.3 Oxaliplatin in der Therapie peritonealer Malignitäten

Im Gegensatz zur CRS, bei welcher Bestrebungen nach Standardisierungen der chirurgischen Durchführung existieren, ist die HIPEC ein äußerst heterogenes und multifaktorielles Therapieverfahren (Helderman et al. 2019; Van der Speeten et al. 2017; Yurttas et al. 2018). Auch wenn dieses bisher international nicht einheitlich wurde, führt die Etablierung eines festgelegten Behandlungsprotokolls nachweislich zu besseren Ergebnissen für den Patienten (Kuijpers et al. 2015). Da jedoch generell die Anwendungen sehr variieren, liegt bislang keine Evidenz für die Bevorzugung eines bestimmten Verfahrens vor. Dementsprechend ist die Bedeutung der vielfältigen Faktoren der unterschiedlichen HIPEC Protokolle und ihre jeweiligen Indikationen nur unzureichend verstanden (Steffen et al. 2020). Zu diesen einzelnen Komponenten gehören u. a. die Auswahl und die Dosierung des Chemotherapeutikums, die Trägerlösung sowie die Expositionsdauer im Rahmen des intraperitoneal durchgeführten hyperthermen Verfahrens (Helderman et al. 2019; Turaga et al. 2014).

Die Dissertation befasst sich mit den pharmakologischen Aspekten, die bei der Verwendung von Oxaliplatin als HIPEC Zytostatikum untersucht werden.

1.3.1 Oxaliplatin

Oxaliplatin lässt sich auf erste Beschreibungen von Kidani et al. an der Universität Nagoya in Japan um 1980 zurückführen (Kidani et al. 1976; Kidani et al. 1980). Die Substanz mit der Summenformel $C_8H_{14}N_2O_4Pt$ hat eine molare Masse von

etwa 397 g/mol (Mathe et al. 1989). Wie aus der Abbildung 1 hervorgeht, besitzt das zentrale Platin einen 1,2-Diaminocyclohexan-Liganden (DACH-Ligand) (Mathe et al. 1989).

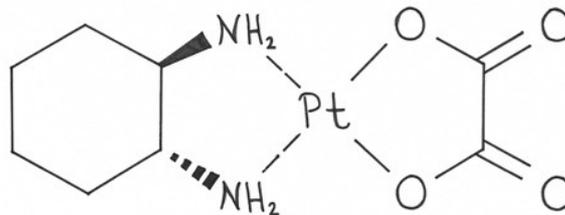


Abbildung 1: Eigene Zeichnung des Moleküls Oxaliplatin angelehnt an (Mathe et al. 1989)

Oxaliplatin weist antitumorale Eigenschaften auf (Raymond et al. 1998). Der zugrunde liegende Wirkmechanismus beruht im Wesentlichen auf Schäden der DNA durch diverse Quervernetzungen und einem Abbruch der Synthese, zusammen mit einer Hemmung der Transkription (Faivre et al. 2003; Raymond et al. 1998; Todd and Lippard 2009). Insbesondere dem DACH-Liganden wird dabei eine tragende Rolle für die zytotoxischen Effekte zugeschrieben (Raymond et al. 1998; Rixe et al. 1996). Das Pharmakon zeichnet sich ferner durch eine verminderte Kreuzresistenz gegenüber Cisplatin aus (Rixe et al. 1996). Auch wenn eine abschließende Klärung noch aussteht, konnte für Oxaliplatin außerdem eine induzierte Immunantwort belegt werden (Stojanovska et al. 2019).

Das Platinderivat liegt im Blutkreislauf anteilmäßig an Plasmaproteine und an Erythrozyten gebunden vor (Graham et al. 2000; Luo et al. 1999; Pendyala and Creaven 1993). Die triphasische Pharmakokinetik von Oxaliplatin weist eine nichtenzymatische Biotransformation auf, bei der sich zahlreiche (in)aktive Zwischenprodukte bilden (Graham et al. 2000; Luo et al. 1999; Pendyala and Creaven 1993). Eine Wirkung auf den Metabolismus über das Zytochrom P450 konnte weitestgehend ausgeschlossen werden (Masek et al. 2009). Oxaliplatin hat eine insgesamt kurze Eliminationshalbwertszeit und wird überwiegend renal ausgeschieden (Allain et al. 2000; Ehrsson et al. 2002; Graham et al. 2000). Eine Nierenschädigung führt trotz Änderungen auf die Pharmakologie des Agens nicht zu einer damit verbundenen Erhöhung der generellen Toxizität (Takimoto et al.

2007). Ebenso ist die Gabe von Oxaliplatin bei Leberfunktionsstörungen uneingeschränkt tolerierbar (Synold et al. 2007). Dennoch sollten eine anhaltende Platinretention bzw. potenzielle Akkumulationen beachtet werden (Brouwers et al. 2008; Gamelin et al. 1997).

1.3.2 Oxaliplatinbasierte HIPEC

Oxaliplatin gehört zu den klinisch häufig eingesetzten Zytostatika (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF) 2019). Die intraperitoneale Verabreichung wurde erstmalig in der Publikation von Elias et al. im Jahr 2002 beschrieben (Elias et al. 2002a). Gerade für die HIPEC Behandlung von PM des CRC findet das Platinderivat überwiegend Verwendung (Morales-Soriano et al. 2018). Die tumorspezifische Zytotoxizität beruht u. a. auf organischen Kationentransportern sowie einem immunogenen Zelltod (Tesniere et al. 2010; Zhang et al. 2006).

1.3.2.1 Operationstechnik

In Tierversuchen wurde für Oxaliplatin gezeigt, dass die offene HIPEC Methodik gegenüber dem geschlossenen Verfahren zu einer verstärkten systemischen Absorption sowie Penetration in das abdominale Gewebe führt (Ortega-Deballon et al. 2010). Darüber hinaus können bei der offenen Technik mit gesteigerten Druckverhältnissen und durch die Hyperthermie die höchsten Konzentrationen des Zytostatikums im Peritoneum erreicht werden (Facy et al. 2012; Facy et al. 2015).

1.3.2.2 Pharmakologie

Die Dosierungsschemata der HIPEC Protokolle können auf verschiedene Weise ermittelt werden. Die COBOX Studie von Lemoine et al. wies für eine konzentrationsbasierte HIPEC im Vergleich zu einer intraperitonealen Chemotherapie auf Grundlage der Körperoberfläche eine höhere Toxizität und Wirksamkeit nach, ohne dabei Abweichungen in der Morbidität und Mortalität zu zeigen (Lemoine et al. 2019). Die Grundannahme der HIPEC eine lokale Maximierung der Wirkstoffkonzentration zu erzielen, konnte für Oxaliplatin im Tiermodell dargelegt werden

(Pestieau et al. 2001). Klinisch ist für das Platinderivat mit der empfohlenen Dosierung von 460 mg/m^2 in 2 l/m^2 nach 30 Minuten eine 25-fach höhere Konzentration intraperitoneal verglichen zu den Plasmaspiegeln beschrieben worden (Elias et al. 2002a). Dies resultiert entsprechend in einer effizienten Aufnahme von Oxaliplatin in das Gewebe, bei der dosisabhängig fast 18-fach höhere Wirkstoffkonzentrationen erreicht wurden (Elias et al. 2002a). Die Penetrationstiefe wird grundsätzlich mit 1-2 mm angegeben (Sugarbaker and Van der Speeten 2016). Zudem ist für Oxaliplatin eine peritoneale Halbwertszeit von 18-49 Minuten dokumentiert worden und es konnte nach einem halbstündigen HIPEC Verfahren eine Absorptionsrate von 40-68 % der Dosis nachgewiesen werden (Chalret du Rieu et al. 2014; Ferron et al. 2008). In diesem Zusammenhang ist schließlich auch in Untersuchungen von Patientenproben ex vivo ein vorteilhaftes Verhältnis zwischen der intraperitonealen Konzentration und einer gleichzeitigen Sensitivität für das Chemotherapeutikum gezeigt worden (Cashin et al. 2013). Im Allgemeinen muss jedoch stets die maximal tolerierbare Dosierung beachtet werden, die bei einer 2-stündigen HIPEC Anwendung mit 200 mg/m^2 angegeben wird (Stewart et al. 2008). Ferner sollen in diesem Kontext ebenfalls die Untersuchungen von Forsythe et al. an Organoiden von Patienten mit PM des CRC und von Appendixneoplasien berücksichtigt werden (Forsythe et al. 2020). Es wurde dargelegt, dass eine hypertherme Therapie mit einer längeren Dauer (2 Stunden) und niedriger dosiertem (200 mg/m^2) Oxaliplatin eine erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu einer kurzzeitigen (30 Minuten) Behandlung mit einem hohen Gehalt (460 mg/m^2) an erhitztem Oxaliplatin aufweist (Forsythe et al. 2020). Die Bedeutung einer längeren lokalen Expositionsdauer des Platinderivats für den Behandlungserfolg ist auch in Experimenten an CRC Zellen bestätigt worden (Kirstein et al. 2008).

Weiterhin ist eine erhöhte Temperatur zur Potenzierung der Wirksamkeit von Oxaliplatin zweckmäßig (Urano and Ling 2002). Die Hyperthermie steigert dabei die Konzentration im peritonealen Gewebe und vermindert parallel die systemische Aufnahme (Piche et al. 2011). Dieser Synergismus konnte in vitro gezeigt werden: Erhöhte Temperaturen führen neben der gesteigerten Aufnahme des Pharmakons zu einer verringerten CRC Zellviabilität (Helderman et al. 2020). Die

schädigende Wirkung bei 43 °C beruht auf einer um 180 % verstärkten Bildung von Platin-DNA Addukten (Rietbroek et al. 1997). Für das Zytostatikum besteht generell eine Hitzebeständigkeit bis 46 °C (Sugarbaker and Van der Speeten 2016).

1.3.2.3 Perfusionslösungen

Eine Erhöhung der intraperitoneal verabreichten Volumina des HIPEC Perfusats kann eine verminderte Absorption und relative Konzentration von Oxaliplatin nach sich ziehen (Elias et al. 2002a). Obgleich hat eine feste Konzentration des Agens in verschiedenen Volumina keine Änderung der Toxizität zur Folge (Liesenfeld et al. 2020).

In Bezug auf die Osmolarität der Trägerlösung ist für eine hypotone Flüssigkeit keine abweichende Absorptions- und Penetrationsrate von Oxaliplatin gegenüber einer isotonen Solution gezeigt worden (Elias et al. 2002b). Bei der Verdünnung des Chemotherapeutikums in Dextrose 5 % wurde für das Platinderivat eine physikalische und chemische Stabilität für mindestens 2 Wochen nachgewiesen (Eiden et al. 2009). In wässrigen Lösungen wird der Grund für die Langzeitbeständigkeit auf das Vorliegen von Assoziationskomplexen zurückgeführt, die sich in physiologisch relevanten Konzentrationen zugunsten der monomeren Formen verschieben (Di Pasqua et al. 2011). Anders ist das Verhalten von Oxaliplatin in chloridhaltigen Trägerlösungen, das als instabil beschrieben wird (Curis et al. 2001; Jerremalm et al. 2004). Es konnte in vitro ein begrenzter Zusammenhang zwischen steigenden Konzentrationen von Chlorid und zunehmenden Abbauraten des Pharmakons hergestellt werden (Mehta et al. 2015). Nach einer hyperthermen Perfusionszeit von 30 Minuten wurde ein Abbau von unter 10 % verzeichnet (Mehta et al. 2015). Hierbei findet eine gemeinsame Reaktion zu einem platinhaltigen Mono- bzw. Dichlor-Komplex statt (Jerremalm et al. 2004). Diese aktive Verbindung könnte in einer erhöhten zytotoxischen Wirksamkeit von Oxaliplatin resultieren (Mehta et al. 2015). Nach dem an der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie Tübingen (AVT) geltenden HIPEC Protokoll wird die Peritonealdialyselösung PHYSIONEAL 40 Glucose 2,27 % w/v / 22,7 mg/ml (PDS) verwendet. Es wird

bei dieser chloridhaltigen Solution vermutet, dass Oxaliplatin mit dem Bestandteil Natriumbikarbonat reagiert (Löffler et al. 2017). Diesen weiterhin Platin enthaltenden Komplexen wurde ein entscheidender Anteil zugesprochen und nur etwa 10-15 % der ursprünglichen Substanz konnte während der HIPEC detektiert werden (Löffler et al. 2017). Die Verbindungen weisen dabei zytotoxische Eigenschaften auf (Löffler et al. 2017).

1.3.2.4 Kombinierte Verfahren

Die systemische Monotherapie mit Oxaliplatin zeigt beim metastasierten CRC Ansprechraten von rund 24 % (Becouarn et al. 1998). In der Kombination mit 5-Fluorouracil-Leucovorin ließ sich eine gegenseitige Einflussnahme und ein synergistischer antineoplastischer Effekt nachweisen (Fischel et al. 2002; Raymond et al. 1997). Dadurch konnte die Ansprechrate beim fortgeschrittenen CRC auf über 50 % erhöht werden (de Gramont et al. 2000; Giacchetti et al. 2000). Entsprechend wurde für diese Erkrankung in Studien ein verbessertes Therapieergebnis belegt (Andre et al. 2004; de Gramont et al. 2000; Kemeny et al. 2004; Rothenberg et al. 2003). Auf dieser Grundlage ist für die HIPEC eine bidirektionale Herangehensweise, bestehend aus der intraperitonealen Gabe von Oxaliplatin und einer parallelen intravenösen Chemotherapie mit 5-Fluorouracil-Leucovorin, übernommen worden (Elias et al. 2002a).

Die zusätzliche lokale Applikation von Irinotecan sorgt für keine Änderung der Pharmakokinetik der oxaliplatinhaltigen HIPEC und führt klinisch zu keinem Vorteil (Elias et al. 2004; Quenet et al. 2011).

1.3.2.5 Nebenwirkungen

Hauptsächlich zählt zu dem Nebenwirkungsprofil von intravenös verabreichtem Oxaliplatin eine akute bzw. chronische Neurotoxizität (Andre et al. 2004; de Gramont et al. 2000; Land et al. 2007). Eine Abschwächung dieser Begleiterscheinung kann u. a. durch die präventive Gabe von Kalzium-Magnesium Infusionen erzielt werden (Gamelin et al. 2004). Neben dem möglichen Auftreten von gastrointestinalen Beschwerden geht von einer systemischen Chemotherapie mit Oxaliplatin ebenfalls die erhöhte Gefahr einer Neutropenie aus (de

Gramont et al. 2000; Kemeny et al. 2004). Der Nachweis einer gehäuften Ototoxizität konnte hingegen nicht erbracht werden (Yuce et al. 2014).

Auch die Therapie der CRS und oxaliplatinbasierten HIPEC ist mit erhöhten Risiken für den Patienten verbunden. In einer Untersuchung im Hinblick auf die Mortalität und Morbidität Grad III/IV lag diese bei 2,5 % und 42,5 % (Glockzin et al. 2013). Hierbei hat v. a. die Wahl der Trägerflüssigkeit Auswirkungen auf den postoperativen Verlauf. Für die HIPEC mit Oxaliplatin in dextroshaltigen Lösungen wurden vermehrt unerwünschte Hyperglykämien und Elektrolytstörungen beschrieben (De Somer et al. 2008; Rueth et al. 2011; Stewart et al. 2018). Durch eine erhöhte Temperatur im Perfusat können diese zusätzlich verstärkt werden (Ceelen et al. 2013). Aufgrund dessen wird in den Niederlanden ein Protokoll mit der Solution Dianeal PD4 (Dextrose 1,36 %) präferiert (Mehta et al. 2017). Darüber hinaus wurden im Vergleich zu anderen verwendeten Zytostatika verstärkt hämorrhagische Komplikationen beobachtet (Charrier et al. 2016). Ferner sind besonders zelluläre Blutbestandteile betroffen, da nicht nur neutrophile Granulozyten, sondern auch Thrombozyten durch dieses Chemotherapeutikum bevorzugt geschädigt werden (Chalret du Rieu et al. 2014; Votanopoulos et al. 2013). Dementgegen hat Oxaliplatin in hypotonischen Lösungen eine hohe Inzidenz für intraperitoneale Blutungen sowie ein vermehrtes Auftreten von Thrombozytopenien zur Folge (Elias et al. 2002b). Schließlich werden vom Patienten in den ersten Wochen nach der multimodalen Therapie zunächst funktionelle Beeinträchtigungen sowie Einschränkungen im körperlichen Wohlbefinden wahrgenommen, die in jedem 5. Fall fortauern (Lim et al. 2010). Langfristig ist bei der HIPEC mit Oxaliplatin allerdings mit einem Erhalt der Lebensqualität zu rechnen (Lim et al. 2010).

1.3.2.6 Studienlage

Die Kombination aus CRS plus oxaliplatinbasierter HIPEC hat sich hauptsächlich bei PM des CRC als klinische Therapieoption etablieren können. Für ausgewählte Patienten liegt der Vorteil in einem krankheitsfreien Langzeitüberleben (Elias et al. 2009; Gervais et al. 2013; Glockzin et al. 2014; Hompes et al. 2012).

Grundsätzlich wurde die Relevanz des hyperthermen Verfahrens mit Oxaliplatin durch die randomisierte, multizentrische Phase-III-Studie namens PRODIGE 7 neuerlich hinterfragt (Quenet et al. 2021). Die spezifische Rolle der HIPEC als Zusatz zur CRS wurde hierbei an 265 Patienten mit PM des CRC im Zeitraum von 2008-2014 in Frankreich untersucht (Quenet et al. 2021). Mit einer begleitenden systemischen (und ggf. zielgerichteten) Therapie wurde die Gruppe der alleinigen CRS mit der Gruppe der CRS plus HIPEC balanciert verglichen (Quenet et al. 2021). Vor der hyperthermen Behandlung erfolgte die intravenöse Gabe von Fluorouracil-Leucovorin (Quenet et al. 2021). Die HIPEC wurde mit Oxaliplatin in dextroserhaltiger Trägerlösung für 30 Minuten bei 43 °C durchgeführt (Quenet et al. 2021). Die Konzentration ist dabei auf 460 mg/m² (offenes Verfahren) bzw. 360 mg/m² (geschlossenes Verfahren) in 2 l/m² standardisiert worden (Quenet et al. 2021). Das Ergebnis der offenen Studie zeigte nach mehr als 5 Jahren ein fast kongruentes medianes Gesamtüberleben von 41,2 Monaten für die alleinige CRS und 41,7 Monaten für die Gruppe mit der additiven HIPEC (Quenet et al. 2021). Die Gesamtüberlebensraten nach 12 Monaten bzw. 5 Jahren lagen für die CRS bei 88,3 % bzw. 36,7 % und für die CRS plus HIPEC bei 86,9 % bzw. 39,4 % (Quenet et al. 2021). Für das mediane rezidivfreie Überleben ergab sich für die Gruppe mit der zusätzlichen hyperthermen Behandlung mit Oxaliplatin eine Verlängerung um 2 Monate (13,1 Monate gegenüber 11,1 Monate) (Quenet et al. 2021). Die Mortalität nach 30 Tagen war mit 2 % identisch (Quenet et al. 2021). Während Komplikationen (Grad III und höher) nach einem Monat ähnlich häufig auftraten, wurden diese nach 60 Tagen vergleichsweise vermehrt in der Gruppe mit oxaliplatinhaltiger HIPEC beobachtet (Quenet et al. 2021). Entsprechend wies letztere einen längeren Krankenhausaufenthalt auf (Quenet et al. 2021).

Eine 2019 publizierte Studie von Ubink et al. unterstützt die These einer unzureichenden Wirksamkeit der HIPEC mit Oxaliplatin (Ubink et al. 2019). An Organoiden von malignem Aszites und von resezierten PM des CRC wurde in vitro nach 30 Minuten unter hyperthermen Bedingungen (42 °C) eine mangelnde Effektivität dieses Zytostatikums festgestellt (Ubink et al. 2019). Die klinisch relevanten Konzentrationen konnten dabei nur unvollständig die Zellen der

5 erlangten Tumorkulturen eliminieren (Ubink et al. 2019). Überdies konnte die oxaliplatinbasierte HIPEC auch bei PM humaner CRC-Zelllinien im Tiermodell keine maßgebliche Zytotoxizität und keine Verbesserung des Überlebens erreichen (Liesenfeld et al. 2020).

Ferner wurde im Rahmen der multizentrischen Studie COLOPEC der zusätzliche Nutzen einer adjuvanten HIPEC (halbstündig bei 42 °C) mit Oxaliplatin (460 mg/m²) bei Patienten mit CRC im perforierten oder T4-Stadium untersucht (Klaver et al. 2019). Anhand von insgesamt 204 eingeschlossenen Patienten zeigte sich hinsichtlich des primären Endpunkts eines PM freien Überlebens nach 18 Monaten keine Verbesserung im Vergleich zu der randomisierten Kontrollgruppe mit einer adjuvanten systemischen Chemotherapie allein (Klaver et al. 2019). Auch vor dem Hintergrund des krankheitsfreien Überlebens konnte in der randomisierten Phase-III-Studie PROPHYLOCHIP-PRODIGE 15 dargelegt werden, dass bei Patienten mit einem hohen Risiko für die Entwicklung von PM des CRC eine Second-Look-Operation plus oxaliplatinbasierter HIPEC nicht den standardmäßigen Nachsorgeuntersuchungen überlegen ist und in 41 % der Fälle mit Komplikationen Grad III/IV einhergeht (Goere et al. 2020).

Im Übrigen wurden vergleichbare Therapieergebnisse für das ebenfalls gebräuchliche HIPEC Protokoll mit Mitomycin C belegt (Zhang et al. 2020). Für das Platinderivat ergaben sich in der direkten Gegenüberstellung vermehrt Nachteile hinsichtlich schwerer Komplikationen (Zhang et al. 2020).

1.4 Wissenschaftliche Fragestellung und Zielsetzung

Grundsätzlich befasst sich diese Dissertation mit der Pharmakodynamik von oxaliplatinhaltigen Spülflüssigkeiten (OCS). Diese werden im Hinblick auf zytotoxische Effekte und auf die Wirkungsweise während einer möglichst realitätsnahen HIPEC Simulation untersucht.

In dem verwendeten Modellsystem repräsentiert die Ovarialkarzinom-Zelllinie OAW42 peritoneale Malignitäten. Diese Zellen werden unter charakteristischen hyperthermen Bedingungen (42 °C) für eine temporäre Exposition von 30 Minuten und 60 Minuten mit den OCS inkubiert und die Wirksamkeit der Behandlung

geprüft. Zu diesem Zweck wird die etablierte Echtzeit-Methode der impedanzbasierten Zellanalytik (Real-Time Cell Analysis) (RTCA) verwendet (ACEA Biosciences Inc. 2013; Agilent Technologies Inc. 2021). Mithilfe von Langzeitmessungen lassen sich allgemein die zellschädigenden Eigenschaften der OCS ermitteln. In Zusammenarbeit mit dem Physiologischen Institut des Universitätsklinikums Tübingen (PIT) werden die Resultate mit den weiteren Versuchen CellTiter Blue (CTB) und Sulforhodamin B (SRB) validiert (O'Brien et al. 2000; Orellana and Kasinski 2016). Durch weiterführende Experimente wird versucht, mögliche Erklärungsansätze zu erhalten.

Für die Versuche ex vivo liegen OCS von 9 Patienten vor, die an der AVT (Kompetenzzentrum für die Chirurgie des Peritoneums der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie) im Zuge der HIPEC Behandlung nach einer definierten Zeitkinetik aus dem Kreislauf gewonnen wurden (Löffler et al. 2017). Dieses intraoperativ entnommene Patientenmaterial (IPM) mit einer mittleren Oxaliplatin Konzentration von 93,7 µg/ml wurde in einer vorangegangenen Publikation bereits näher charakterisiert sowie die Wirksamkeit in Langzeitversuchen etabliert (Löffler et al. 2017). Ferner werden in vitro hergestellte OCS in klinisch relevanten Dosierungen getestet. Vor dem Hintergrund der fehlenden Effektivität einer HIPEC Therapie nach dem Protokoll der PRODIGE 7 Studie wird diese unter möglichst identischen Bedingungen simuliert und die Faktoren der Behandlung analysiert (Quenet et al. 2021). Die hieran angelehnte Methodik einer 30-minütigen hyperthermen Dauer sowie der Solution von Oxaliplatin in die Glucosteril 5 % Infusionslösung (D5W) wird in Vergleich zu dem an der AVT angewandten Verfahren gesetzt. Dieses weicht hinsichtlich der Konzentration einschließlich der Verdünnung des Zytostatikums in die PDS ab.

Die Zielsetzung der Dissertation bezieht sich somit im klinischen Kontext auf die Charakterisierung der pharmakologischen Wirksamkeit von Oxaliplatin im Rahmen der HIPEC hinsichtlich der verschiedenen Faktoren wie der Dosierung, der Einwirkzeit und der Eindringtiefe auf malignen Zellen sowie der Verdünnung in unterschiedlichen Trägerlösungen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

Im Allgemeinen sind die hier aufgeführten Materialien, die grundsätzlich rechtlichen Formalien wie Copyrights oder Trademarks unterliegen können, nicht gekennzeichnet. Gleiches gilt für die jeweiligen (inter)nationalen Unternehmensformen (u. a. AG, GmbH, GmbH & Co. KG, KG, KGaA bzw. länderspezifisch: BV, Co., Corp., Inc., LLT, LTD, PLC, S.A.). Es wird entsprechend auf die offizielle Registrierung verwiesen. Für die Angaben der Materialien sind die jeweiligen Produktbeschreibungen mit ihren individuell verwendeten Abkürzungen gemäß der Herstellerangaben wörtlich übernommen worden. Die Groß- und Kleinschreibungen sowie Satzzeichen wurden ggf. angepasst und vereinheitlicht. Die Länder sind nach der normierten ISO 3166 ALPHA-2 Kodierliste abgekürzt. In den nachfolgenden Tabellen 1-4 und in der Tabelle 6 werden die Materialien links und die dazugehörigen Hersteller rechts aufgeführt.

2.1.1 Tabellarische Verzeichnisse

Tabelle 1: Auflistung der Geräte

Durchflusszytometrie	
BD FACSCanto II Flow Cytometer REF: 338962 SN: V96300177 UKT ID: 340838, Inv. Nr. UT: 157330	BD Biosciences (San Jose, US)
Inkubatoren	
CO ₂ -Inkubator HERAcell vios 250i Order Code: 51030966 Serial No.: 42073423 UKT ID: 10068780	Thermo Electron LED (Langenselbold, DE)
Inkubationsbad Typ 1003 No.: 11020896 F UKT ID: 74114	GFL (Burgwedel, DE)
Inkubationsschüttler Multitron UKT ID: 340935, 340936	Infors HT (Bottmingen, CH)

Kühl- und Gefrierschränke	
4 °C KGT 3946-24B/001 Inv. Nr. UT: 150035, Anlagen-Nr.: 216675	Liebherr-International (Bulle, CH)
-20 °C 20 GN 230 F / 05 SEGCOOLSTAR / 03 D	SEG (n.a.)
-81 °C E 80-450 S Ger.Nr.: 29072067 Inv. Nr. UT: 146692 Skadi DF8514GL Serial No.: NIA0074 UKT ID: 10065166	Colora Messtechnik (Lorch, DE) ilShin Europe (Ede, NL)
Mikroskope	
DM IL UKT ID: 61890, ID-Anlagen-Nr.: 156410	Leica (Wetzlar, DE)
ECLIPSE Ti2-E 541562 mit microscope cage incubator	Nikon (Tokio, JP) Okolab (Pozzuoli, IT)
Revolve RVL-100-G Serial: D-00118-RVL UKT ID: 10077412	DISCOVER ECHO (San Diego, US)
pH-Wert Messung	
SevenExcellence InLab pH-Einstabmesskette mit Flüssig-Elektrolyt, InLab Micro Pro	Mettler-Toledo (Greifensee, CH)
Kalibrierfertiglösungen Technical Buffer Solution pH 4,01 Order no.: 51 302 069 LOT: 1E129H Technical Buffer Solution pH 7,00 Order no.: 51 302 047 LOT: 1D320A Technical Buffer Solution pH 9,21 Order no.: 51 302 070 LOT: 1D326B Technical Buffer Solution pH 10,01 Order no.: 51 302 079 LOT: 1D240G	Mettler-Toledo, Analytical (Schwerzenbach, CH)

ddH ₂ O (Ampuwa)	Fresenius Kabi Deutschland (Bad Homburg v. d. Höhe, DE)
Pipettierhilfe	
Elektronischer Dispenser Multipette stream Anlagen-Nr: 244386	Eppendorf (Hamburg, DE)
DISCOVERY Comfort Single-Channel: 0,1÷2 µl, 0,5÷10 µl, 10÷100 µl, 20÷200 µl, 100÷1000 µl Multi-Channel: 20÷200 µl	PZ HTL (Warschau, PL)
PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences (Zizers, CH)
PIPETMAN P1000	Gilson (Middleton, US)
RTCA	
xCELLigence RTCA SP Analyzer Model: W380 Analyzer SN: 28-1-1005-1379-7 Station Model: 1x96 SP Station: 26-1-1010-1334-2 Station SN: 261090412555 UKT ID: 10046797	ACEA Biosciences (San Diego, US), Roche Diagnostics (Mannheim, DE)
Inkubator BB 16 Function Line Bestell Nr.: 51012726 Fabrik Nr.: 97107004 UKT ID: 61995	Heraeus INSTRUMENTS (Hanau, DE)
Notebook EliteBook 6930p	HP (Palo Alto, US)
RTCA Cleaning Equipment: Dust Blower Nylon Brush RTCA Contact Pins 96 RTCA Contact Pin Insertion Tool RTCA Contact Pin Replacement Tool Tweezer	ACEA Biosciences (San Diego, US), Roche Diagnostics (Mannheim, DE)
Sicherheitswerkbank	
3F150-II GS Inv. Nr. UT: 149810, 149811, 149812	INTEGRA Biosciences (Zizers, CH)

Vortexmischer	
MS1 UKT ID: 74111	IKA-Works (Wilmington, US)
Zentrifugen	
Biofuge fresco Bestell-Nr.: 75005510/01 Fabr.-Nr.: 265111 Inv. Nr. UT: 157356	Heraeus INSTRUMENTS (Hanau, DE)
Fresco 17 UKT ID: 10075435	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
Labofuge 400 Function Line UKT ID: 61882	Heraeus INSTRUMENTS (Hanau, DE)
Megafuge 1.0R UKT ID: 156476	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)

Tabelle 2: Auflistung des Equipments

Autoklavierband	
Comply Steam Indicator Tape REF: 1322-18MM LOT: 181024	3M (St. Paul, US)
Gefrierbehälter	
NALGENE Mr. Frosty Cryo 1 °C Freezing Container Cat. No.: 5100-0001	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
Multiwell-Platten	
CELLSTAR 6 Well Cell Culture Plate REF: 657160 Cat.-No.: 657 160 LOT: E1904379	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
96 Well Cell Culture Plate F-bottom Cat.-No.: 655 180 LOT: E1905344	
U-bottom Cat.-No.: 650 180 LOT: E18093JB	
V-bottom Cat.-No.: 651 180 LOT: E190438V	

Pipetten	
Combitips advanced 2,5 ml Cat. no.: 0030089650 LOT: I182776I	Eppendorf (Hamburg, DE)
5 ml Cat. no.: 0030089669 LOT: H1793600	
10 ml Cat. no.: 0030089677 LOT: G175268Q	
Falcon Serological Pipet 2 ml REF: 356507 LOT: 7010008	Corning (Corning, US)
5 ml REF: 356543 LOT: 8078003	
10 ml REF: 356551 LOT: 8274004	
25 ml SPACE SAVER REF: 356525 LOT: 8317003	
Costar Stripette 50 ml Product Number: 4501 LOT: 35217007	
Plastikbeutel	
Entsorgungsbeutel Cat. No.: 7597 05	BRAND (Wertheim, DE)
Reagenzresevoir	
Costar 50 ml REF: 4870 LOT: 02819141	Corning (Corning, US)
100 ml REF: 4872 LOT: 00719166	
Reaktionsgefäße	
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 ml Order no.: 0030 121.023 LOT: I182606H	Eppendorf (Hamburg, DE)

<p>1,5 ml Order no.: 0030 120.086 LOT: I181763G</p> <p>2,0 ml Order no.: 0030 120.094 LOT: H180682R</p>	
Röhrchen	
<p>CELLSTAR Tubes 15 ml, conical bottom Cat.-No.: 188 271 LOT: E190435W</p> <p>50 ml, conical bottom Cat.-No.: 227 261 LOT: E19043GC</p> <p>50 ml, conical bottom with support skirt Cat.-No.: 210 261 LOT: E190534Q</p>	<p>Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)</p>
<p>Cryo.s Einfrierröhrchen 2 ml Innengewinde REF: 122263 LOT: E19043NV</p> <p>Außengewinde REF: 126263 LOT: E19023GS</p>	<p>Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)</p>
<p>Falcon Rundbodenröhrchen 5 ml Hersteller Art.-Nr.: 352008 LS-Nr.: 9457543</p>	<p>Corning (Corning, US)</p>
Saugkomresse	
<p>Vliwazell 10 × 20 cm REF: 30 451</p>	<p>Lohmann & Rauscher (Neuwied, DE)</p>
Verschlussfolie	
<p>Parafilm M PM-999 Hersteller Art.-Nr.: 701606 LS-Nr.: 9444044</p>	<p>Bemis Company (Neenah, US), Pechiney Plastic Packaging (Chicago, US)</p>
Zählkammer	
<p>Neubauer Improved 0,100 mm Tiefe 0,0025 mm²</p>	<p>Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht (Sondheim vor der Rhön, DE)</p>

Zellkulturflasche	
CELLSTAR Cell Culture Flasks 250 ml, 75 cm ² REF: 658170 LOT: E18053OT	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
550 ml, 175 cm ² REF: 660160 LOT: E18113W3	
Zellsieb	
EASYstrainer 40 µm REF: 542040 LOT: M190436	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)

Tabelle 3: Auflistung der elektronischen 96-Well-Platten

E-Plate 96 REF: 05 232 368 001 LOT: 20160123, ID: 095991 (6 plates) LOT: 20160123, ID: 095996 LOT: 20160547, ID: 099669 (6 plates) LOT: 20171216, ID: 109504 LOT: 20171216, ID: 109505 LOT: 20171216, ID: 109506 LOT: 20171216, ID: 109509 LOT: 20171216, ID: 109546 LOT: 20171216, ID: 109547 LOT: 20171216, ID: 109548 LOT: 20171216, ID: 109549 LOT: 20171216, ID: 109550 LOT: 20171216, ID: 109551 LOT: 20180110, ID: 109986 LOT: 20180762, ID: 117886 (6 plates) LOT: 20180762, ID: 117888 LOT: 20180762, ID: 117889 LOT: 20180762, ID: 117890 LOT: 20180762, ID: 117891	ACEA Biosciences (San Diego, US), Roche Diagnostics (Mannheim, DE)
RTCA Resistor Plate 96 REF: 05 232 350 001 LOT: 20101101, ID: R01597	

Tabelle 4: Auflistung der Materialien

Experimente	
Fixation Buffer 100 ml Cat: 420801 LOT: B260274	BIOZOL Diagnostica Vertrieb (Eching, DE)
Glucosteril 5 % Infusionslösung Glucose-Monohydrat (Ph.Eur.) 100 ml PZN: 07813054 Ch.-B.: 14MC24/0034, 14MC24/0045, 14MH25/0069	Fresenius Kabi Deutschland (Bad Homburg v.d.H., DE)
Oxaliplatin-GRY 5 mg/ml 10 ml PZN: 5947833 Ch.-B.: 1510512	TEVA (Ulm, DE)
Oxaliplatin Kabi 5 mg/ml 10 ml PZN: 05527829 Ch.-B.: 21MC0109, 21NC0066	Fresenius Kabi Oncology (Bordon, GB)
Peritonealdialyselösung PHYSIONEAL 40 Glucose 2,27 % w/v / 22,7 mg/ml 1500 ml B5247 Lot/Ch B: 14K28G10	Baxter Healthcare (Castlebar, IE)
Triton X-100 LOT: SLBF4531V	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Viability Staining Solution 7-Aminoactinomycin D	BioLegend (San Diego, US)
Zellkultur	
Gibco DMEM (1X) Dulbecco's Modified Eagle Medium 500 ml REF: 41965 LOT: 1979052, 2124909	Life Technologies (Carlsbad, US)
Gibco DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 500 ml REF: 14190 LOT: 1976785, 2098157	Life Technologies (Carlsbad, US)
EMSURE ACS Dimethylsulfoxid 1 l CAS-No: 67-68-5 LOT: K50088952 840	Merck (Darmstadt, DE) EMD Millipore (Billerica, US)

Fetal Bovine Serum 500 ml F7524 LOT: BCBQ9326V	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Penicillin-Streptomycin 100 ml P4333 LOT: 018M4859V	Sigma-Aldrich (St. Louis, US)
Trypsin / EDTA Solution (10x) 0,5 % / 0,2 % (w/v) in PBS w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺ 100 ml L2153 LOT: 0266E	Biochrom (Berlin, DE)

Tabelle 5: Inhaltsangaben von der D5W und PDS

D5W (1000 ml)	
Glucose-Monohydrat (Ph.Eur.)	55,0 g
≙ wasserfreie Glucose	50,0 g
Gesamtenergie	840 kJ/l ≙ 200 kcal/l
pH-Wert	3,5-6,5
Titrationacidität	< 1 mmol NaOH/l
theor. Osmolarität	277 mosm/l
Wasser für Injektionszwecke	
Salzsäure 25 % (zur pH-Wert-Einstellung)	
Natriumhydroxid (zur pH-Wert-Einstellung)	
PDS (1000 ml)	
Zusammensetzung nach dem Mischen:	
Glucose-Monohydrat	25,0 g/l
entspr. wasserfreie Glucose	22,7 g/l
Calciumchlorid-Dihydrat	0,184 g/l
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	0,051 g/l
Natriumchlorid	5,38 g/l
Natriumhydrogencarbonat	2,10 g/l
Natrium-(S)-lactat-Lösung	1,68 g/l
Wasser für Injektionszwecke	
Kohlendioxid	
Osmolarität	395 mOsmol/l
Zusammensetzung in der gemischten Lösung:	
Wasserfreie Glucose C ₆ H ₁₂ O ₆	126 mmol/l
Na ⁺	132 mmol/l
Ca ⁺⁺	1,25 mmol/l
Mg ⁺⁺	0,25 mmol/l

Cl ⁻	95 mmol/l
HCO ₃ ⁻	25 mmol/l
C ₃ H ₅ O ₃ ⁻	15 mmol/l
pH-Wert	7,4

Tabelle 6: Auflistung der Auswertungs- bzw. Softwareprogramme

Daten	
Microsoft Excel, Version 16.44	Microsoft (Redmond, US)
Durchflusszytometrie	
FlowJo, Version 9.2	FlowJo (Ashland, US)
Grafiken	
Inkscape, Version 1.0.1	Open Source Scalable Vector Graphics Editor
Prism, Version 9.0.0	GraphPad Software (San Diego, US)
Mikroskopie	
ImageJ, Version 1.52	Public Domain
NIS-Elements	Nikon (Tokio, JP)
RTCA	
RTCA Software, Version 1.2.1.1002	ACEA Biosciences (San Diego, US), Roche Diagnostics (Mannheim, DE)

2.1.2 Zelllinien

2.1.2.1 OAW42

Die Zelllinie OAW42 ist aus dem Aszites einer Patientin mit einem Ovarialtumor gewonnen worden und klassifiziert den epithelialen Typ eines serös-papillären Zystadenokarzinoms (Wilson 1984). Die nahezu tetraploiden Zellen wachsen unter Bildung eines adhärennten Monolayers und die Verdoppelungszeit beträgt 19 Stunden (Hill et al. 1984; Hills et al. 1989). Sie besitzen eine Empfindlichkeit

auf Platin, die speziell für Oxaliplatin mit 0,05 μM angegeben wird (Hills et al. 1989; Roberts et al. 2005).

Die Zelllinie OAW42 wurde von der European Collection of Authenticated Cell Cultures (Public Health England) (Salisbury, GB), General Collection mit der Katalognummer: 85073102, bezogen und durch die Abteilung für Immunologie des Interfakultären Instituts für Zellbiologie Tübingen zur Verfügung gestellt.

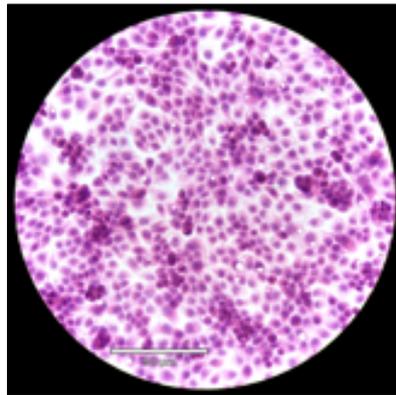


Abbildung 2: Eigene mikroskopische Aufnahme der OAW42 Zellen

Mikroskopie der OAW42 Zellen in der PDS nach einer hyperthermen Behandlung von 30 Minuten. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Weißer Maßstabsbalken entspricht 90 μm .

2.1.2.2 Caco2

Die Zelllinie Caco2 entspricht einem humanen Kolonkarzinom (Fogh et al. 1977). Die Verdoppelungszeit beträgt ca. 32 Stunden (Visanji et al. 2004). Ein eingefrorener Bestand wurde von Frau Dr. Latifa Zekri-Metref bereitgestellt.

2.2 Angewandte Methodiken und Auswertungen

Die Tätigkeiten im Labor wurden bei Raumtemperatur und ggf. mit adäquater persönlicher Schutzausrüstung vorgenommen. Bestmögliche sterile Bedingungen wurden durch das Arbeiten unter einer Sicherheitswerkbank sowie der Desinfektion mit 70%igem Alkohol weitestgehend garantiert.

Die Ausführung der Labortätigkeit ist u. a. durch die Eingliederung in die Arbeitsgruppe, durch die Protokolle der Hersteller und durch einschlägige Literatur gewährleistet worden (Schmitz 2011; Schmitz and Desel 2018).

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Mykoplasmen

Eine bakterielle Kontamination mit Mykoplasmen ist ein häufiges Problem mit vielfältigen Auswirkungen auf das Verhalten der Zellkultur (Drexler and Uphoff 2002). Diese kleinsten Organismen kommen sowohl extra- als auch intrazellulär vor und haben ein langsames Wachstumsverhalten (Drexler and Uphoff 2002). Zur Kontrolle wurde mindestens einmal pro neuer Zellkultur eine Untersuchung auf einen Befall mit Mykoplasmen vorgenommen. Die Überprüfung ist mittels einer kommerziellen Polymerase-Kettenreaktion von Minerva Biolabs (Berlin, DE) nicht eigenhändig durchgeführt worden (Drexler and Uphoff 2002). Nach Entnahme von 1,5 ml des Kulturüberstands aus der Zellkulturflasche (ZKF) mit eindeutiger Beschriftung der Zelllinie, der Passagenummer sowie den Namensinitialen, erfolgte die Testung durch die Labortechnikerin Frau Claudia Falkenburger. Alle an den verwendeten Zellkulturen vorgenommenen Untersuchungen auf Mykoplasmen waren negativ.

2.2.1.2 Materialien

Als Grundlage für die Zellkultur diente das Nährmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium. Nachdem initial 55 ml daraus entfernt wurden, ist dieses mit 50 ml fetalem Kälberserum (FKS) sowie mit 5 ml Penicillin-Streptomycin versetzt worden. Aus diesem Mischverhältnis mit 10 % FKS und 1 % Penicillin-Streptomycin ergab sich das Medium MEM. Die Kombination der Antibiotika diente präventiv zur Vorbeugung einer Kontamination mit grampositiven und gramnegativen Bakterien (Schmitz 2011). Eine Blasenbildung ist während des Vorgangs weitestgehend vermieden worden. Nach Ansetzen des MEM wurden aus diesem Sterilkontrollen entnommen. Die jeweils mit 3 ml gefüllten Wells einer 24-Well-Platte sind inkubiert und für mehrere Tage beobachtet worden. Sowohl eine optische Kontrolle als auch eine lichtmikroskopische Überprüfung hinsichtlich einer möglichen Verunreinigung bzw. Trübung wurde routinemäßig durchgeführt. Auf einen möglichen Farbumschlag des Indikators Phenolrot im MEM wurde geachtet. Eine Veränderung der Farbe zu gelb beruht auf einem Sinken des pH-Werts. Ursächlich für den Wechsel in ein saures Milieu kann eine bakterielle Infektion mit der

Anhäufung von Stoffwechselprodukten oder die durch Proliferation einhergehende, metabolische Aktivität mit dem Verbrauch des Nährstoffangebots sein (Schmitz 2011). Bei Unauffälligkeit ist die Sterilkontrolle verworfen worden.

Für die Verwendung von Trypsin/EDTA wurden 5 ml aus der Ursprungslösung mit 45 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) 1:10 verdünnt.

2.2.1.3 Lagerung

Die Aufbewahrung von DPBS erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Alle sonstigen benötigten Materialien wurden bis zum Gebrauch in den Kühl- und Gefrierschränken gelagert. Ausschließlich bei Bedarf fand eine Erwärmung im Inkubationsbad (37 °C) statt. Der Verschluss wurde mit Parafilm abgedichtet und der Flaschenhals über dem Wasserspiegel positioniert.

Das Zellmaterial wurde temporär bei -81 °C und langfristig in Flüssigstickstoff bei -196 °C gelagert. Da die zellulären Prozesse bei Temperaturen unter -130 °C zum Erliegen kommen, ist mithilfe der Kryokonservierung eine zeitlich unbefristete Aufbewahrung möglich (Schmitz 2011). Die Vitalität sowie die Eigenschaften der Zellen bleiben dabei erhalten (Schmitz 2011). Das eingefrorene Zellmaterial beinhaltete jeweils $2,0-3,0 \times 10^6$ Zellen pro ml in einer relativ niedrigen Passagenummer, da mit einem verhältnismäßig hohen Verlust sowohl beim Vorgang des Einfrierens als auch beim Prozess des Auftauens gerechnet werden musste. Für die Lagerung wurden die Zellen in Einfriermedium aufgenommen, das sich aus 90 % FKS und 10 % des penetrierenden Kryoprotektivums Dimethylsulfoxid zusammensetzte. Letzteres dient als Gefrierschutzmittel und verhindert zelluläre Schäden (Schmitz 2011). Aufgrund der generell hohen Toxizität von Dimethylsulfoxid musste die Bearbeitungszeit möglichst kurz gehalten werden (Schmitz 2011).

2.2.1.3.1 Einfrieren

Nachdem die Zellkultur in Lösung gebracht und eine definierte Zellzahl gewonnen wurde (s. 2.2.1.4), erfolgte die Zentrifugation bei 1200 rpm/280 g für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in Einfriermedium vorsichtig suspendiert. Die 2 ml Einfriereröhrchen wurden nicht maximal

befüllt. Für einen schonenden und stufenweisen Prozess der Kryokonservierung kamen auf 4 °C vorgekühlte und mit ausreichend Isopropanol befüllte Gefrierbehälter zum Einsatz. Diese gewährleisteten eine kontrollierte Abkühlrate von 1 °C pro Minute. Schließlich wurde das eingefrorene Zellmaterial in die langfristige Lagerung überführt.

2.2.1.3.2 Auftauen

Nach Entnahme des Einfrierröhrchens aus dem Langzeitbestand ist dieses unmittelbar in das 37 °C warme Inkubationsbad gegeben worden. Unter manuellem Schwenken wurde ein schnellstmögliches Auftauen des zuvor eingefrorenen Zellmaterials vorgenommen. Ab dem Zeitpunkt, an dem nur noch vereinzelt Eiskristalle sichtbar waren, erfolgte nach vorheriger Desinfektion unverzüglich der Transfer unter die Sicherheitswerkbank. Die Zellen wurden in vorgewärmtem MEM aufgezogen, in ein Röhrchen überführt und der leere Kryobehälter mehrfach nachgespült. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 1200 rpm/280 g schloss sich das Entfernen des Überstands an. Es folgte die Suspension in MEM und die Übernahme in die vorbereitete ZKF. Initial fand die Kultivierung in der kleineren ZKF (250 ml/75 cm²) statt. Bei ausreichendem Wachstum konnte der Wechsel in die nächstgrößere ZKF (550 ml/175 cm²) durchgeführt werden.

2.2.1.4 Subkultivierung

Bei den Tumorzellen kommt es zu einer ungehinderten, fortwährenden Zellteilung (Schmitz 2011). Um den Erhalt der kultivierten Zellen zu ermöglichen, ist ein Passagieren ab einer bestimmten Zelldichte innerhalb der ZKF bzw. ab der vollständigen Konfluenz der Wachstumsfläche vorzunehmen. Die jeweiligen Schritte des Pipettierens erfolgten stets unter Ausschluss eines direkten Kontakts mit der Zellkultur. Damit ist einer etwaigen mechanischen Ablösung der Zellen entgegen gewirkt worden.

Für die Subkultivierung wurde zunächst das verbrauchte MEM vollständig aus der ZKF entnommen. Es sind 1-2 Waschvorgänge mit 10 ml DPBS durchgeführt worden, indem dieses gleichmäßig verteilt und anschließend wieder verworfen wurde. Um die Zellschicht von der Unterseite der ZKF zu lösen und dadurch die

Zellen in Suspension zu bekommen, wurden 2,5 ml (ZKF 250 ml, 75 cm²) bzw. 4,5 ml (ZKF 550 ml, 175 cm²) Trypsin/EDTA hinzugegeben. Das Enzym Trypsin, eine Serinprotease, proteolysiert adhäsive Zellkontakte (Schmitz 2011). Der Komplexbildner EDTA dient dabei als Beschleuniger (Schmitz 2011). Auf eine vollständige Bedeckung der Wachstumsfläche wurde geachtet. Zur Aktivierung der Wirkung von Trypsin/EDTA erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 5-10 Minuten. Eine längere Kontaktzeit wurde aufgrund der zellschädigenden Eigenschaften vermieden. Ein leichtes Klopfen auf den Boden der ZKF sowie ein Unterspülen mit MEM dienten als Unterstützung für ein nahezu vollständiges Ablösen der adhären Zellen. Zur Überprüfung des Erfolgs fand eine Kontrolle mit dem bloßen Auge und unter dem Mikroskop statt. Um die Enzymreaktion unmittelbar abzuschwächen bzw. aufzuheben, wurde MEM mindestens im Verhältnis 2:1 hinzugegeben (entsprechend ungefähr 10 ml). Nach Überführen in ein 50 ml Röhrchen schloss sich eine 5-minütige Zentrifugation bei 1200 rpm/280 g an. Bei einem stabilen Zellpellet wurde der Überstand durch einmaliges Dekantieren entfernt, bevor eine Suspension in ein festgelegtes Volumen an MEM (standardmäßig exakt 10 ml) vorgenommen wurde.

Damit eine Subkultivierung in einem definierten Verhältnis reproduzierbar ist, erfolgte an dieser Stelle eine Zellzählung. Diese wurde mithilfe der Zählkammer durchgeführt. Das durch Anhauchen leicht befeuchtete Deckglas ist fest ange-drückt worden, bis Newtonsche Ringe sichtbar waren. Aus einer Probe der Suspension mit einem hohen Vereinzelnungsgrad wurden 20 µl entnommen und mit derselben Menge an Trypanblau 0,05 % (in PBS plus 0,02 % Natriumazid) vermischt. Dieser saure Farbstoff dient ausschließlich dem Nachweis von toten Zellen, vitale zeigen sich mikroskopisch hell (Schmitz 2011). Aus dieser Verdünnung wurden 20 µl seitlich in die Zählkammer pipettiert. Das Zählraster war hierbei ausgefüllt und ohne Luftbläschen durchsetzt. Es wurden alle 4 Großquadrate mäanderförmig ausgezählt. Damit eine Doppelzählung der auf Grenzlinien liegenden Zellen vermieden wurde, sind 2 Ränder im Voraus ausgeschlossen worden. Die finale Zellzahl ergab sich durch folgende Formeln:

$$\text{Arithmetisches Mittel}_{\text{Großquadrate}} (\bar{X}_G) = \left(\frac{\text{Summe der Zellen aller Großquadrate}}{4} \right)$$

Zellzahl = $\bar{X}_G \times 2$ (Verdünnungsfaktor) \times ml Suspension $\times 10^4$ (Kammerfaktor).

Die gewünschte Anzahl von Zellen wurde in eine neue ZKF überführt (ZKF 250 ml/75 cm²: 1,0-1,5 $\times 10^6$ Zellen bzw. ZKF 550 ml/175 cm²: 1,8-2,5 $\times 10^6$ Zellen) und homogen in 25 ml (ZKF 250 ml/75 cm²) bzw. 40 ml (ZKF 550 ml/175 cm²) MEM verteilt.

Zur Gewährleistung von optimalen Wachstumsbedingungen wurde die Zellkultur bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 7,5 % inkubiert. Durch den Schritt des Passagierens erhöhte sich die Nummer der Subkultivierung um die Zahl 1.

2.2.2 RTCA

2.2.2.1 Hintergrund

Das xCELLigence RTCA SP Gerät basiert auf einer nichtinvasiven Messung der Impedanz, die mithilfe einer elektronischen 96-Well-Platte, der E-Plate 96, erfolgt (ACEA Biosciences Inc. 2013). Aufgrund der Echtzeit-Methode kann kontinuierlich die Zellproliferation quantifiziert, Veränderungen in der Morphologie und Adhäsion detektiert sowie die Lebensfähigkeit der Zellen ermittelt werden (ACEA Biosciences Inc. 2013).

Die Funktionseinheit jedes Wells setzt sich aus Goldelektroden zusammen, welche fingerförmig ineinandergreifend etwa 4/5 der Grundfläche bedecken (Agilent Technologies Inc. 2021). Bei dem Kontakt mit einer leitfähigen Lösung entsteht ein elektrisches Potenzial von 22 mV, das einen Stromfluss erzeugt (Agilent Technologies Inc. 2021). Wenn die notwendige Schnittstelle durch die Gegenwart von angehefteten Zellen behindert ist, wird der Stromkreis unterbrochen (Agilent Technologies Inc. 2021). Dieser elektrische Widerstand wird auch als Impedanz bezeichnet. Das Ausmaß der Isolierung ist von der Anzahl der Zellen, ihrer Größe und Form sowie den Eigenschaften der Zell-Oberflächen-Interaktion abhängig (Agilent Technologies Inc. 2021). Generell besteht durch diese Art der Messung keine Einflussnahme auf das Zellverhalten (Agilent Technologies Inc. 2021). Die durch die Zellen hervorgerufenen Veränderungen der Impedanz werden zunächst ohne Maßeinheit als sogenannter Zellindex (CI) angegeben (Agilent Technologies Inc. 2021).

2.2.2.2 Grafische Darstellung

Die Experimente der RTCA weisen einen charakteristischen Kurvenverlauf in der graphischen Darstellung auf. Das Aussäen sowie allmähliche Absetzen der Zellen auf den mit Goldelektroden besetzten Boden der E-Plate 96 führt zu einer Zunahme des elektrischen Widerstands (Agilent Technologies Inc. 2021). Insbesondere das rasche Absinken der anfangs noch in Suspension befindlichen Zellen bewirkt zu Beginn der Messung einen schnellen Anstieg der detektierten Impedanz (Agilent Technologies Inc. 2021). Die sich anschließende Adhäsion und Zellproliferation drückt sich in einer fortwährenden Steigung der Kurve grafisch aus (Agilent Technologies Inc. 2021). Im Laufe der Zeit stellt sich ein Plateau ein, welches sich korrelierend auf eine vollständige zelluläre Konfluenz am Boden der Wells zurückzuführen lässt (Agilent Technologies Inc. 2021). Der maximale CI ist damit erreicht (Agilent Technologies Inc. 2021). Bei den OAW42 Zellen umfassten diese Werte konstant einen nicht normierten Bereich zwischen 10 und 14. Zu einem definierten Zeitpunkt werden die Zellen den zytotoxischen Substanzen ausgesetzt (Agilent Technologies Inc. 2021). Allgemein erfasst das xCELLigence RTCA SP Gerät die unterste Zellschicht, da sich Veränderungen im Messverhalten lediglich im direkten Kontakt mit den Goldelektroden ergeben (Agilent Technologies Inc. 2021). Die Induktion des Zelltods und der dadurch bedingten Ablösung von der Oberfläche der E-Plate 96 wird durch eine Abnahme der Impedanz sichtbar (Agilent Technologies Inc. 2021). Der CI kann dabei bis auf das Ausgangsniveau der Leerwertmessung zurückgehen. Im Gegensatz zu dem sofortigen Verlust der Membranintegrität durch eine Lyse (s. Positivkontrolle mit Triton X-100), ist der durch die Zytostatika hervorgerufene Zelltod ein Prozess, welcher mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung einhergeht (s. Behandlung mit Oxaliplatin).

2.2.2.3 Materialien

Triton X-100 (Positivkontrolle) ist mit DPBS auf 1 % verdünnt worden. Die PDS wurde durch die AVT bereitgestellt. Bis zu der Verwendung erfolgte eine lichtgeschützte Aufbewahrung. Unmittelbar vor dem Abfüllen in 50 ml Röhrchen ist die

Trennnaht des 1500 ml Beutels geöffnet worden, um den Inhalt beider Kammern vollständig zu durchmischen.

Die Konzentrationsreihe des Zytostatikums Oxaliplatin wurde aus der Ausgangslösung von 5 mg/ml hergestellt. Diese ist zunächst im Mischverhältnis 1:10 auf 500,0 µg/ml verdünnt worden, entweder mit der PDS oder mit der D5W. Hieraus entstanden schließlich die Konzentrationen 460,0 µg/ml bzw. 360,0 µg/ml. Diese wurden weiter auf 230,0 µg/ml bzw. 180,0 µg/ml halbiert. Letztere Lösungen sind wiederum sukzessive auf einen minimalen Wert von 5,6 µg/ml über die Zwischenschritte von 90,0 µg/ml, 45,0 µg/ml, 22,5 µg/ml und 11,2 µg/ml verdünnt worden.

2.2.2.4 IPM

Der Entnahme des IPM ist das schriftliche Einverständnis sowie das genehmigte Votum durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen (Projektnummer: 367/2013B01) vorausgegangen. Insgesamt wurden 9 Patienten eingeschlossen, die im Zuge ihrer Erkrankung mit der HIPEC Methode behandelt wurden (Löffler et al. 2017). Intraoperativ sind dabei nach Zugabe von Oxaliplatin in den Spülkreislauf die OCS zu insgesamt 7 (die Patienten 1-7) bzw. 5 Zeitpunkten (die Patienten 8-9) gewonnen worden: pre (0 min.), 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min. (Löffler et al. 2017). Einige Charakteristika und Eigenschaften dieses IPM wurden bereits in der Publikation von Löffler et al. beschrieben und die Wirksamkeit in Langzeitversuchen etabliert (Löffler et al. 2017).

Die Proben sind vor der Lagerung bei -81 °C einmal zentrifugiert worden, um grobe Gewebereste und andere Schwebstoffe zu entfernen. Aus diesem Bestand der AVT ist das IPM in eigene Röhrchen abgefüllt worden. Dazu wurden die Proben zunächst im Kühlraum bei -4 °C und anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Inhalt wurde anschließend in je 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 15 Minuten mit 13000 rpm/16060 g erneut zentrifugiert. Ein Pellet aus unerwünschten Rückständen wurde an der Gefäßseite unberührt zurückgelassen, der Überstand vorsichtig an der gegenüberliegenden Seite abgenommen und zur Lagerung in Einfrierröhrchen überführt.

2.2.2.5 Methodik

2.2.2.5.1 Allgemein

Für die einzelnen Experimente ist jeweils eine neue E-Plate 96 benützt worden. Es wurde insgesamt mit einem Fassungsvermögen von 200 µl pro Well gearbeitet. In jedem Versuch sind mindestens Triplikate und höchstens 6-fache Replikate verwendet worden. Vereinzelt kam es zu einem abweichenden Layout der eingegebenen Übersicht in der RTCA Software und dem pipettierten Schema, da erst nach Beginn der Messungen technische Fehler (bspw. durch Ausreißer oder ein fehlendes Anwachsen der Zellen) aufgetreten sind. Dies ist im Forschungs-Protokollbuch und in der Auswertung vermerkt worden, damit etwaig auftretende Vertauschungen vermieden wurden.

Das Starten der Messung erfolgte erst nach einer 10-minütigen Verweildauer der E-Plate 96 im xCELLigence RTCA SP Gerät, um einen Ausgleich der Temperaturdifferenz zwischen der Raumtemperatur (Sicherheitswerkbank) und dem CO₂-Inkubator (37 °C) zu erreichen. Beim Einlegen wurden automatisch die Verbindungen zwischen den Goldelektroden und den Messpins überprüft. Dabei kam es regelrecht zu Fehlermeldungen. Unter Zuhilfenahme des mitgelieferten RTCA Cleaning Equipments wurde versucht die entsprechende Verknüpfungsstelle zu reinigen und den Kontakt regulär herzustellen. Trotz den Bemühungen war die Problematik bei einigen Verbindungen nicht zu beheben. Das xCELLigence RTCA SP Gerät wurde regelmäßig durch eine komplette Reinigung mit Alkohol sowie der Entnahme, Säuberung und ggf. dem Austausch einzelner Messpins instand gehalten.

Zur Methodvalidierung kamen stets adäquate Kontrollen zum Einsatz. Die Positivkontrolle ist mit Triton X-100 durchgeführt worden, welches als Detergens zu einer Auflösung der Zellmembran führt (Schmitz and Desel 2018). Für die Negativkontrolle wurden die PDS, die D5W oder das MEM verwendet. Bei diesen Lösungen war kein Abfall der Impedanz anzunehmen.

2.2.2.5.2 Experiment Tag 1

Am mitgelieferten Laptop sind zunächst in der installierten Software die Daten für das Experiment (Name, Dateiverzeichnis) sowie das zuvor festgelegte Layout

der E-Plate 96 eingegeben worden. Das Zeitschema wurde in 2 Schritten ausgewählt: Der erste beinhaltete eine einmalige Messung der Leerwerte ohne die Zellen (Step 1), der zweite die kontinuierliche Analyse (Step 2). Für die einzelnen Messungen ist ein 15-minütiges Intervall bestimmt worden. Die 750 gespeicherten Durchläufe beliefen sich auf eine maximale Gesamtlaufzeit von 187 Stunden, 15 Minuten und 39 Sekunden. Einige Experimente sind schon vorher beendet worden.

Die rein rechnerisch je Versuch benötigte Anzahl von Zellen betrug $4,8 \times 10^6$ (jeweils $50,0 \times 10^3$ Zellen in 96 Wells). Um einen möglichen Zellverlust (bspw. durch die Zentrifugation oder durch die Verwendung eines Zellsiebs) auszugleichen sowie aufgrund der technischen Anwendbarkeit wurde sicherheitshalber mit $6,0 \times 10^6$ Zellen pro Experiment verfahren. Diese sind aus der aktuellen Zellkultur gewonnen worden (s. 2.2.1.4). Dafür waren zum Teil mehrere ZKF parallel notwendig. Unter Zuhilfenahme eines Zellsiebs wurde die definierte Menge in ein 50 ml Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm/280 g für 5 Minuten. Daran schloss sich sowohl das Verwerfen des Überstands als auch die Suspension in 12 ml MEM an. Letztendlich ergab sich hierdurch die Ziellösung von $50,0 \times 10^3$ Zellen in je 100 μ l MEM.

Damit eine Normalisierung möglich war, ist zuerst eine Leerwertmessung am xCELLigence RTCA SP Gerät durchgeführt worden (Step 1). Mithilfe des elektronischen Dispensers (Aufziehvolumen: 5 ml, Zielvolumen: 0,1 ml, Schritte: 100, Speed: gering) wurden 100 μ l MEM in jedes Well der E-Plate 96 gegeben und als Referenzwert standardisiert. Im zweiten Schritt sind mit derselben Vorgehensweise jeweils $50,0 \times 10^3$ Zellen, gelöst in 100 μ l MEM, in die einzelnen Wells pipettiert worden. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen nach ihrer Aussaat wurde durch manuelle, 8-förmige Bewegungen der Platte gewährleistet. Nach der 10-minütigen Inkubationszeit ist die kontinuierliche Messung aufgenommen worden (Step 2).

2.2.2.5.3 Experiment Tag 2

An dem darauffolgenden Tag sind zunächst zum einen die benötigten Materialien (Positiv- und Negativkontrollen, IPM bzw. OCS) aufgetaut und zum anderen der

Inkubationsschüttler vorbereitet worden. Um die HIPEC ex vivo möglichst realitätsgetreu zu simulieren, wurden für die Bedingung der Hyperthermie 42 °C und für die homogene Verteilung ein sanftes Schütteln von 50 rpm eingestellt. Die Überprüfung der Zieltemperatur fand mittels eines herkömmlichen Glasthermometers statt. Nach Abschluss der Vorarbeiten und nach dem Ablauf der mindestens 24-stündigen Kultivierung der Zellen wurde die laufende Messung (Step 2) pausiert. Unmittelbar darauf erfolgte die Entnahme der E-Plate 96 aus dem xCELLigence RTCA SP Gerät und der Transport unter die Sicherheitswerkbank. Das MEM wurde durch Abschütten und durch das einmalige, sanfte Abklopfen auf eine vorbereitete Saugkomprese entfernt. Ein wiederholtes Nachklopfen ist weitestgehend unterlassen worden, sodass ein Ablösen der adhärenen Zellkultur verhindert wurde. Mit der Multi-Channel Pipettierhilfe folgte ein Waschvorgang mit 200 µl DPBS pro Well. Auch hierbei wurde darauf geachtet, keinen Zellverlust zu erleiden. Durch das vorsichtige Pipettieren am Rand des Wells ist ein Unterspülen der Zellschicht vermieden worden. Das anschließende Entfernen des flüssigen Inhalts wurde mit derselben Methodik unter Zuhilfenahme der Saugkomprese vorgenommen. Als Nächstes sind die Wells mit den Kontrollen und dem IPM bzw. den OCS entsprechend dem am Vortag festgelegten Schema schnellstmöglich befüllt worden. Um die Homogenität der Proben zu gewährleisten, wurden diese sowohl in der Vorbereitung als auch direkt vor dem Pipettieren mit dem Vortexmischer auf maximaler Geschwindigkeit (2500/Minute) durchmischt. Danach ist die E-Plate 96 zweimal in einen Plastikbeutel verschlossen, mit Autoklavierband auf ein Rack befestigt und in den aufgewärmten Inkubationsschüttler gestellt worden. Die HIPEC Simulation wurde für exakt 30 Minuten und 60 Minuten durchgeführt.



Abbildung 3: Eigene Aufnahme der HIPEC Simulation im Inkubationsschüttler

Nach Ablauf der hyperthermen Behandlung wurde umgehend die E-Plate 96 wieder aus dem Inkubationsschüttler entnommen, unter der Sicherheitswerkbank ausgepackt und der flüssige Inhalt der Wells durch das kurze Abklopfen auf eine Saugkompressen entfernt. Auf dieselbe Art wie bereits beschrieben, folgten ein Waschschrift mit DPBS und die Hinzugabe von 200 μl MEM pro Well für die mehrtägige Weiterkultivierung. Im Anschluss an ein 10-minütiges Ruhen im Inkubator wurde die pausierte Messung (Step 2) wieder aufgenommen.

Im Laufe der Laborarbeiten entstanden Weiterentwicklungen hinsichtlich der Methodik und es ergaben sich geringe Modifikationen. Erfahrungsgemäß kam es zu einem relevanten Zellverlust v. a. bei den Versuchen mit Oxaliplatin in der D5W nach einer 60-minütigen HIPEC Behandlung. Um möglichst schonend mit den Zellen umzugehen, wurde die Technik des Abklopfens belassen und fortan der Inhalt vorsichtig abpipettiert. Testdurchläufe mit Proben nach einer vorherigen, zusätzlichen Zentrifugation oder nach einem Weglassen des Waschschrifts erwiesen sich als nicht Vorteil bringend.

2.2.2.5.4 Etablierte Langzeitversuche

Die Grundlage der Langzeitversuche stellte die bereits etablierte Methodik von Löffler et al. dar (Löffler et al. 2017). Die allgemeine Vorgehensweise entsprach dabei größtenteils dem bisher geschilderten Verfahren unter Berücksichtigung der im Folgenden beschriebenen Abweichungen.

Am ersten Tag des Experiments wurden pro Well 50 μl MEM für die Leerwertmessung verwendet. Mithilfe des elektronischen Dispensers (Aufziehvolumen: 5 ml, Zielvolumen: 0,05 ml, Schritte: 100, Speed: gering) sind $50,0 \times 10^3$ Zellen, gelöst in 50 μl MEM, hinzugefügt worden. Dafür wurde eine Gesamtzahl von $6,0 \times 10^6$ benötigten Zellen nach der vorherigen Auszählung und Zentrifugation in 6 ml MEM suspendiert. Entsprechend des maximalen Fassungsvermögens der Wells erfolgte am Tag 2 des Experiments die Zugabe von 100 μl der Kontrollen und Proben in Übereinstimmung mit dem Layout. Eine Vermischung wurde vorsichtig durch die Pipette und manuellen, 8-förmigen Bewegungen erzielt. Es ist dabei zu beachten, dass es durch diesen Ablauf zu einer hälftigen Verdünnung kam (Löffler et al. 2017). Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden

daher für die Experimente der kontinuierlichen Exposition mit den in vitro OCS die doppelten Konzentrationen von Oxaliplatin verwendet.

2.2.2.5.5 Wiederverwendung der E-Plate 96

In dieser Dissertation ist die E-Plate 96 ausschließlich im Einmalgebrauch benutzt worden. Für eine höhere Effizienz des Bedarfsmaterials ist allerdings eine Wiederverwendung grundsätzlich möglich (Stefanowicz-Hajduk et al. 2016). Entgegen der Empfehlung des Herstellers sind bei einem mehrmaligen Gebrauch der E-Plate 96 keine nachteiligen Effekte auf die Resultate der Experimente zu erwarten (Stefanowicz-Hajduk et al. 2016). Für potenziell nachfolgende Versuche ist ein entsprechendes Vorgehen im Rahmen dieser Arbeit getestet worden. Nach der Verwendung wurde die gebrauchte E-Plate 96 2-malig mit DPBS gewaschen, 100 µl Trypsin/EDTA jedem Well hinzugegeben und für mehrere Stunden inkubiert (Stefanowicz-Hajduk et al. 2016). Anschließend erfolgten erneut 2 Waschschriffe mit DPBS. Nach einer vorangegangenen mikroskopischen Kontrolle auf etwaige zelluläre Restbestände wurde die E-Plate 96 lichtgeschützt verpackt und gelagert (Stefanowicz-Hajduk et al. 2016). Vor der erneuten Benutzung bietet es sich weiterhin an, die Platten zu sterilisieren.

2.2.2.6 Auswertung

Für die Vergleichbarkeit zwischen den unabhängigen Versuchen wurde eine Vereinheitlichung des dimensionslosen CI vorgenommen. Dieser normierte Zellindex (CI_n) = 1 ist auf den Zeitpunkt vor der HIPEC Simulation und damit auf das Pausieren nach der 24-stündigen Kultivierung der Zellen standardisiert worden. Für die Auswertung wurden insgesamt folgende 2 Datensätze in Microsoft Excel exportiert, sortiert und ausgewertet: zum einen die allgemeinen Rohdaten und zum anderen die durch die Software ermittelten Durchschnittswerte mit Standardabweichung. Letztere sind nach Ausschluss von Ausreißern (bspw. eine negative Impedanz, extreme Spitzenwerte oder Verbindungsprobleme zwischen den Goldelektroden der E-Plate 96 und den Messpins des xCELLigence RTCA SP Geräts) durch die Einstellung Average und STD DEV im Softwareprogramm erhalten worden. Einzelne Messwerte wurden dementsprechend

eigenverantwortlich nach einer mehrmaligen Überprüfung und Rücksprache aus dem Datensatz entfernt. Im Allgemeinen ist eine höchstmögliche Anzahl von Replikaten angestrebt worden. Für die finale Darstellung der Ergebnisse wurde eine Versuchsdauer von insgesamt 120 Stunden (96 Stunden nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen) festgelegt. Nach dieser Zeit sind die Auswertungen nicht mehr verlässlich, da ein Verlust der Zellvitalität u. a. durch den Verbrauch der Nährstoffe des im Well enthaltenen MEM bedingt sein kann. In der grafischen Veranschaulichung wurden die Werte im Intervall von 6 Stunden abgebildet.

2.2.3 Messung der pH-Werte

Zunächst ist eine Kalibrierung durch die verschiedenen Kalibrierfertiglösungen (pH 4,01, pH 7,00 und pH 10,01 bei 20,9 °C) sowie durch die Bestimmung eines bekannten pH-Wertes (pH 9,21 bei 20,9 °C) vorgenommen worden. Nach dem Auftauen und Durchmischen der Proben (IPM, MEM, PDS, D5W sowie die in vitro hergestellten OCS in den Konzentrationen 11,2 µg/ml, 22,5 µg/ml, 45,0 µg/ml, 90,0 µg/ml, 180,0 µg/ml, 360,0 µg/ml und 460,0 µg/ml in der PDS und der D5W) wurde die Glaselektrode vollständig in das jeweilige Gefäß eingetaucht. Der Endpunkt ergab sich entweder automatisch strikt oder manuell standardisiert nach dem Ablauf von einer Minute. Nach der Beendigung der Datenerhebung ist die Messung durch die Fertiglösung (pH 9,21) erneut kontrolliert worden. Um eine Verfälschung der Analyse zu verhindern, wurde zwischen den einzelnen Arbeitsschritten die Messelektrode mit ddH₂O (Ampuwa) abgespült und mittels eines sauberen Wischtuchs vorsichtig trocken getupft.

2.2.4 Atomabsorptionsspektroskopie (extern)

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) ist extern im MVZ Dr. Eberhard & Partner Dortmund vorgenommen worden (Auftragsnummer: STUD-2019-028). Die Routinemethode wurde für Platin mit dem Grafitrohr AAS (Additionskalibration mit Matrix) durchgeführt. Die Messungen sind in der Einheit µg/l angegeben worden. Die Bestimmungsgrenze lag bei 20 µg/l (Umrechnung Oxaliplatin mit dem Faktor 2,03). Die interne Dokumentation und Rückverfolgung ist über Barcodes erfolgt (die Zuordnung s. Forschungs-Protokollbuch).

Nachdem für 24 Proben jeweils $10,0 \times 10^6$ Zellen in einem 50 ml Röhrchen bereitgestellt wurden, sind diese in 4 ml der jeweiligen Lösungen (PDS, D5W sowie die in vitro hergestellten OCS in den Konzentrationen 22,5 µg/ml, 45,0 µg/ml, 90,0 µg/ml, 180,0 µg/ml und 230,0 µg/ml) suspendiert worden. Für diesen Schritt ist ein paralleles Arbeiten erfolgt. Eine Durchmischung der Flüssigkeiten ist vorausgegangen. Ebenfalls sind 2 ml der Lösungen als initiales Auswertungsmaterial in voretikettierte Röhrchen entnommen worden (entspricht den Proben: PRE). Daraufhin ist die HIPEC für 30 Minuten und 60 Minuten bei 42 °C und 120 rpm im Inkubationsschüttler simuliert worden. Es folgte unmittelbar eine Zentrifugation bei 1200 rpm/280 g für 5 Minuten. Der sich hieraus ergebende Überstand (4 ml) wurde durch ein Dekantieren entfernt und aufbewahrt (entspricht den Proben: POST). Nach einem Waschschrift durch Suspension in 5 ml DPBS, schloss sich erneut eine analoge Zentrifugation mit dem Verwerfen der flüssigen Phase an. Durch die Suspension des zurückgebliebenen Zellpellets in 2 ml Triton X-100 wurde das abschließende Material gewonnen (entspricht den Proben: ZELLEN). Die insgesamt 72 Röhrchen sind neben dem Stopfen mit Verschlussfolie abgedichtet und bis zum Versand bei -20 °C archiviert worden.

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Hintergrund

Die Durchflusszytometrie ermöglicht neben der quantitativen Bestimmung von Zellen eine Analyse ihrer physikalischen und molekularen Eigenschaften (Schmitz and Desel 2018). In einem Flüssigkeitsstrom verdünnt, passieren diese einzeln mit hoher Geschwindigkeit einen Laserstrahl bestimmter Wellenlänge (Schmitz and Desel 2018). Durch die entstehende Lichtstreuung bzw. Anregung eines Fluoreszenzsignals kann die Charakterisierung der Zellen erfolgen (Schmitz and Desel 2018). Als Maß für die Zellgröße dient die Vorwärtslichtstreuung, welche die Brechung des Lichts im flachen Winkel zum Laserstrahl angibt (Schmitz and Desel 2018).

2.2.5.2 Methodik und Auswertung

Mehrere Replikate von $1,0 \times 10^5$ Zellen wurden in 2 separaten 96-Well-Platten mit u-förmigem Boden verwendet. Die Zellen sind hierfür in 150 μ l MEM, PDS und D5W aufgenommen worden. Das HIPEC Verfahren wurde bei 42 °C und 30 rpm parallel für 30 Minuten und 60 Minuten simuliert. Unmittelbar vor der Durchflusszytometrie sind jedem Well 600 ng/ml 7-Aminoactinomycin D zur Färbung von toten Zellen hinzugefügt worden (Schmid et al. 1992). Letztere sowie Dubletten wurden in der Auswertung ausgeschlossen. Es sind voneinander unabhängige Experimente durchgeführt worden. Der Vorwärtsstreulicht-Bereich (FSC-A) diente als Indikator für die Zellgröße. Die Bedienung des BD FACSCanto II Flow Cytometers sowie die Auswertung mittels FlowJo erfolgte mit der Unterstützung von Herrn Dr. med. Joseph Kauer.

2.2.6 Mikroskopie

Bei der Zellaussaat kann es durch sogenannte Randeffekte zu Varianzen innerhalb der Multiwell-Platte kommen (Lundholt et al. 2003). Um diesen nicht unwesentlichen Einflussfaktor weitestgehend zu minimieren, ist stellenweise eine Vorinkubation und das randständige Befüllen mit einer Flüssigkeit (DPBS) vorgenommen oder ganz auf die Verwendung der äußeren Wells verzichtet worden (Lundholt et al. 2003).

2.2.6.1 Methodik und Auswertung

Eine unterschiedliche Anzahl von OAW42 Zellen wurde in eine 96-Well-Platte ausgesät. Mehrere Replikate von jeweils $12,5 \times 10^3$, $20,0 \times 10^3$, $25,0 \times 10^3$, $35,0 \times 10^3$ und $50,0 \times 10^3$ Zellen pro Well sind in 200 μ l MEM inkubiert worden. Nach der 24-stündigen Kultivierung wurde das MEM entfernt und ein Waschvorgang mit DPBS folgte. Um die Zellen zu fixieren, ist jedem Well mindestens 50 μ l Fixation Buffer hinzugegeben und für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur belassen worden. Im Anschluss wurde der Inhalt abpipettiert, einmal gewaschen und gegen Austrocknung mit 100 μ l DPBS befüllt. Nach Abdichtung mit Verschlussfolie ist die 96-Well-Platte bei 4 °C gelagert worden.

Die Experimente sind jeweils in Triplikaten und in 2 unabhängigen Wiederholungen vorgenommen worden, allerdings einmalig ohne die Anzahl von $20,0 \times 10^3$ und $35,0 \times 10^3$ Zellen pro Well. Das Maß für die Dicke der Zellschicht ist in 10-facher Vergrößerung mit dem Mikroskop ECLIPSE Ti2-E bestimmt worden. Die Analyse wurde mittels ImageJ und NIS-Elements durchgeführt. Dabei sind im Programm Z-Stacks ermittelt worden, indem eigenständig die Ober- und Untergrenze der Zellschicht definiert wurde. Die Messung und Auswertung fand mithilfe von Frau Dr. rer. nat. Franziska Herster statt.

2.2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit der Unterstützung von Herrn Jürgen Winter ist nach entsprechendem Protokoll eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung der OAW42 Zellen u. a. in der PDS nach einer vorherigen 30-minütigen hyperthermen Behandlung (42 °C) vorgenommen worden (Fischer et al. 2008). Die Deckgläser wurden auf einen Objektträger überführt und mit Eindeckmittel fixiert. Am Vortag sind dafür Wells einer 24-Well-Platte mit $1,0 \times 10^5$ Zellen, gelöst in 500 μl MEM, und weiteren 500 μl MEM befüllt und für 24 Stunden kultiviert worden.

2.2.6.3 Aufnahmen

Eine Serie von Bildern der OAW42 (und Caco2) Zellen wurde mit den Mikroskopen ECLIPSE Ti2-E und Revolve RVL-100-G durch Frau Dr. rer. nat. Franziska Herster aufgenommen.

2.2.7 PIT (extern)

Teile der eigenen Ergebnisse wurden ohne einen Eigenanteil durch das PIT mit 2 zusätzlichen Versuchen überprüft: Der fluorometrische Assay CTB basiert auf der Umwandlung von Resazurin in Resorufin, welche nur in lebenden Zellen vorkommt, sowie die Testung mit SRB, das unter milden sauren Bedingungen stöchiometrisch an Proteine bindet (O'Brien et al. 2000; Orellana and Kasinski 2016).

2.3 Grafische Darstellungen und veröffentlichte Inhalte

Die Resultate der Experimente sind mittels Inkscape und Prism grafisch dargestellt worden. Einzelne Abbildungen wurden gemeinsam mit Herrn Dr. med. Markus W. Löffler erstellt.

Inhalte dieser Dissertation sind am 31. Juli 2019 auf dem Preprint Server bioRxiv veröffentlicht worden (Löffler et al. 2019). Daraus sind einige Abbildungen modifiziert übernommen worden.

3 Ergebnisse

3.1 RTCA: ex vivo IPM der Patienten 1-9, HIPEC 30/60 Minuten

3.1.1 IPM der Patienten 1-9, HIPEC 30 Minuten

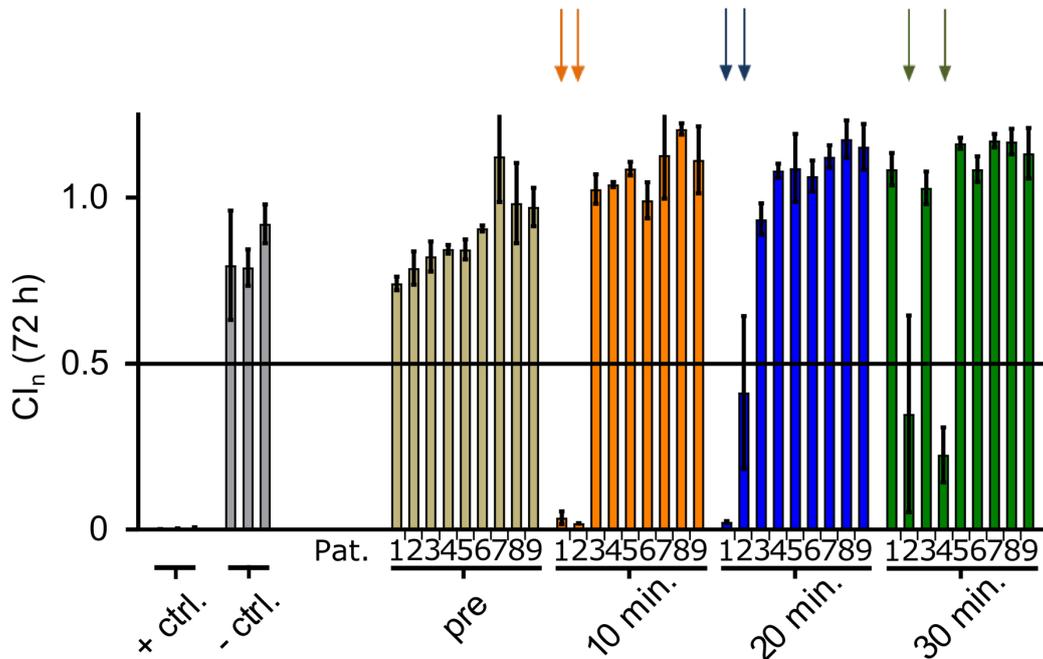


Abbildung 4: IPM der Patienten 1-9, HIPEC 30 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten, 42 °C und 50 rpm.

X-Achse: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.) (graue Kolorierungen) und IPM der Patienten (Pat.) 1-9, jeweils die Proben pre (goldene Kolorierungen), 10 min. (orangene Kolorierungen), 20 min. (blaue Kolorierungen) und 30 min. (grüne Kolorierungen).

Y-Achse: Cl_n zum Zeitpunkt 72 Stunden (72 h). Farbige Pfeile markieren je einen durchschnittlichen Abfall des Cl_n (72 h) unter 0,5 (schwarze Waagerechte).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-5.

Modifizierte Grafik aus der Veröffentlichung: Seite 7, „Figure 1. Cell exposure for 30/ 60 minutes at 42 °C in a time resolved in vitro model system using oxaliplatin-containing solutions (OCS) obtained from patients during HIPEC, assessing drug effects at three days after treatment by impedance based real time cell analysis (RTCA).“, a (Löffler et al. 2019).

Die Positivkontrollen (Triton X-100) zeigen nach 3 Tagen einen Cl_n (72 h) nahe dem Nullniveau auf. Bei den Negativkontrollen (PDS) sowie den jeweiligen Proben pre der 9 Patienten ist mit interindividuellen Schwankungen ein geringer Verlust in Bezug auf den Referenzwert Cl_n (72 h) = 1 zu verzeichnen. Das IPM

des Patienten 1 und Patienten 2 zum Zeitpunkt 10 min. und 20 min. weist einen Rückgang der Zellviabilität auf, auch wenn bei der Probe 20 min. von Patient 2 mit einem $Cl_n(72\text{ h}) = 0,4129$ nur knapp ein mittlerer Verlust von unter 50 % detektiert wird. Das äquivalente IPM der Patienten 3-9 zeigt nach dieser Zeit keine wesentlichen Veränderungen in der gemessenen Impedanz. Ähnlich verhält es sich mit den Proben 30 min., da hier ausschließlich bei Patient 2 und Patient 4 ein durchschnittlicher Rückgang des $Cl_n(72\text{ h}) < 0,5$ nachweisbar ist. Wie anhand der Pfeile erkenntlich ist, sind insgesamt 6 Patientenproben mit einem zytotoxischen Effekt nach der 30-minütigen HIPEC Simulation verbunden.

3.1.2 IPM der Patienten 1-9, HIPEC 60 Minuten

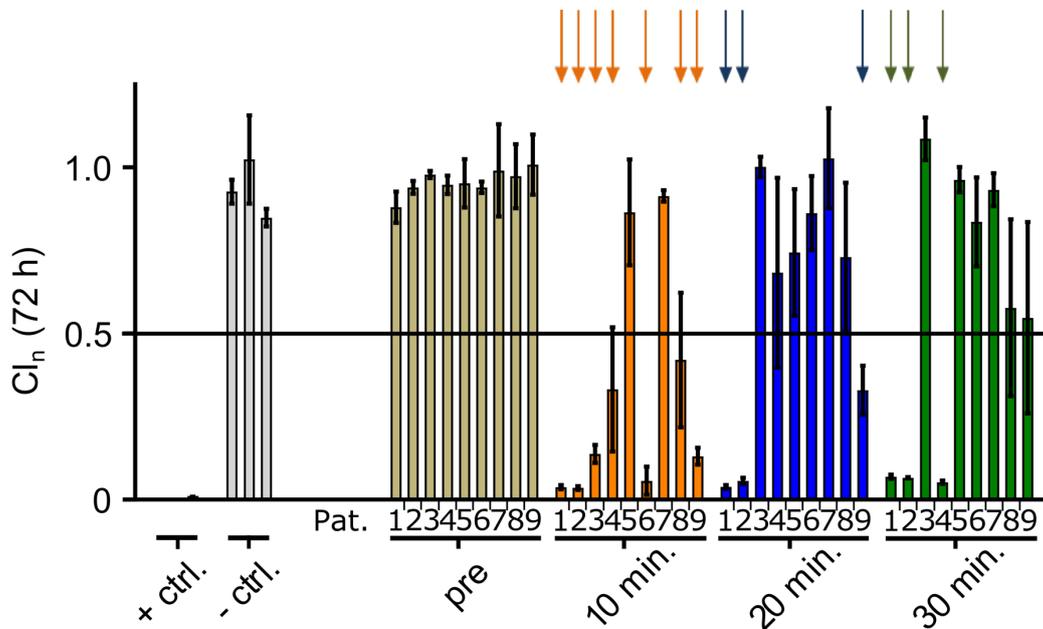


Abbildung 5: IPM der Patienten 1-9, HIPEC 60 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 60 Minuten, 42 °C und 50 rpm.

X-Achse: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.) (graue Kolorierungen) und IPM der Patienten (Pat.) 1-9, jeweils die Proben pre (goldene Kolorierungen), 10 min. (orangene Kolorierungen), 20 min. (blaue Kolorierungen) und 30 min. (grüne Kolorierungen).

Y-Achse: Cl_n zum Zeitpunkt 72 Stunden (72 h). Farbige Pfeile markieren je einen durchschnittlichen Abfall des $Cl_n(72\text{ h})$ unter 0,5 (schwarze Waagerechte).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-5.

Modifizierte Grafik aus der Veröffentlichung: Seite 7, „Figure 1. Cell exposure for 30/ 60 minutes at 42 °C in a time resolved in vitro model system using oxaliplatin-

containing solutions (OCS) obtained from patients during HIPEC, assessing drug effects at three days after treatment by impedance based real time cell analysis (RTCA).”, b (Löffler et al. 2019).

Bei den Positivkontrollen (Triton X-100) lässt sich ein Rückgang der gemessenen Impedanz auf Nullwerte nachweisen, während sich die Negativkontrollen (PDS) sowie die Proben pre aller 9 Patienten nach 3 Tagen stabil um den $CI_n (72 h) = 1$ halten. Aus der Grafik wird ersichtlich, dass insgesamt das IPM zum Zeitpunkt 10 min. vermehrt einen Verlust der Zellviabilität offenbart. Insbesondere für die Proben von Patient 1 und Patient 2 lässt sich ein zytotoxischer Effekt darlegen, wohingegen sich der Patient 5 und Patient 7 nahezu konträr verhalten.

Letztendlich konnte sich für das beschriebene IPM, das bereits nach dem halbstündigen HIPEC Verfahren zu einem durchschnittlichen Unterschreiten des $CI_n (72 h) = 0,5$ geführt hat (s. 3.1.1), auch bei der 60-minütigen hyperthermen Exposition eine zellschädigende Wirkung entsprechend bestätigen. Letzteres trifft ebenfalls auf 7 weitere Patientenproben zu, wie in der Grafik durch insgesamt 13 Pfeile verdeutlicht ist.

3.1.3 IPM der Patienten 1-9 einzeln, HIPEC 30/60 Minuten

Anhand von 3 beispielhaft ausgewählten Patienten wird die interindividuelle Variabilität während der HIPEC Simulation ex vivo detailliert aufgezeigt und hervorgehoben. Ergänzend findet sich das IPM der weiteren Patienten der Vollständigkeit halber nachfolgend ohne eine jeweilige Beschreibung angehängt.

3.1.3.1 IPM von Patient 1, HIPEC 30/60 Minuten

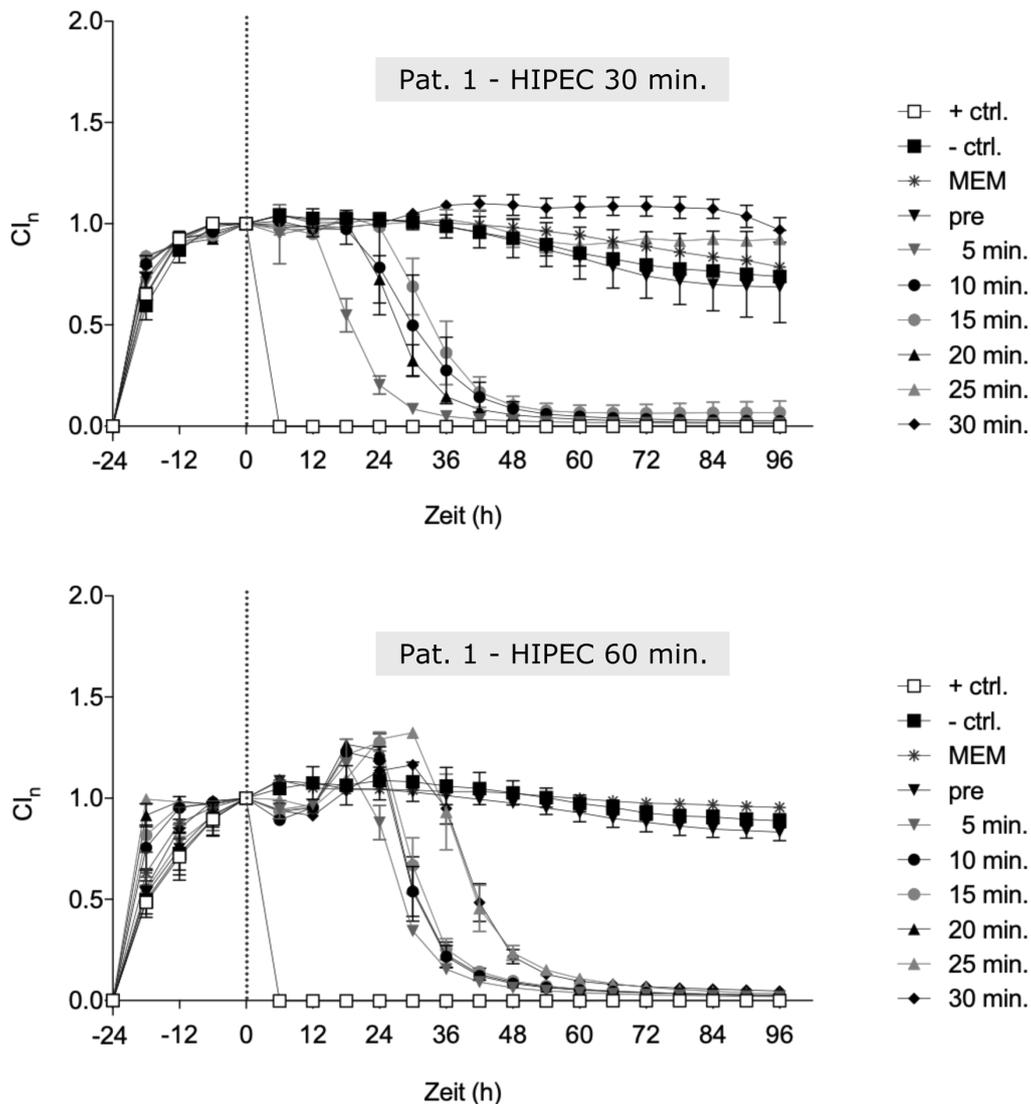


Abbildung 6: IPM von Patient 1, HIPEC 30/60 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten (obere Grafik) und 60 Minuten (untere Grafik), 42 °C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.), MEM und IPM von Patient 1 (Pat. 1): pre, 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 96 Stunden.

Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-4.

Modifizierte Grafiken aus der Veröffentlichung: Seite 9, „Figure 2. Cell exposure for 30 or 60 minutes at 42 °C in a time resolved in vitro model system using oxaliplatin-containing solutions (OCS) obtained from patients during HIPEC.“, c und d (Löffler et al. 2019).

In beiden RTCA-Experimenten kommt es bei den Positivkontrollen (Triton X-100) unmittelbar zu einem nachweisbaren Zelluntergang. Demgegenüber halten die Negativkontrollen (PDS) und das MEM das Niveau des Cl_n nach der 24-stündigen Kultivierung bei. Nach der halbstündigen HIPEC führen die Proben der Zeitpunkte 5-20 min. sukzessive zu einem erkennbaren Verlust der Zellviabilität, spätestens nach 2 Tagen beträgt der Cl_n (48 h) nahezu 0. Wird die hypertherme Behandlung über die doppelte Zeit simuliert, zeigen alle Proben bis auf pre eine zytotoxische Aktivität auf. Vereinzelt ist hierbei ein vorangehender Anstieg der gemessenen Impedanz auffallend, der maximal beim IPM zum Zeitpunkt 25 min. einen Cl_n (30 h) = 1,3241 erreicht.

Zusammenfassend weist das IPM von Patient 1 eine hohe zellschädigende Wirksamkeit bereits nach einer 30-minütigen HIPEC Simulation auf (4 von 7 Proben), die ferner bei einer auf 60 Minuten verlängerten Exposition verstärkt wird (6 von 7 Proben).

3.1.3.2 IPM von Patient 3, HIPEC 30/60 Minuten

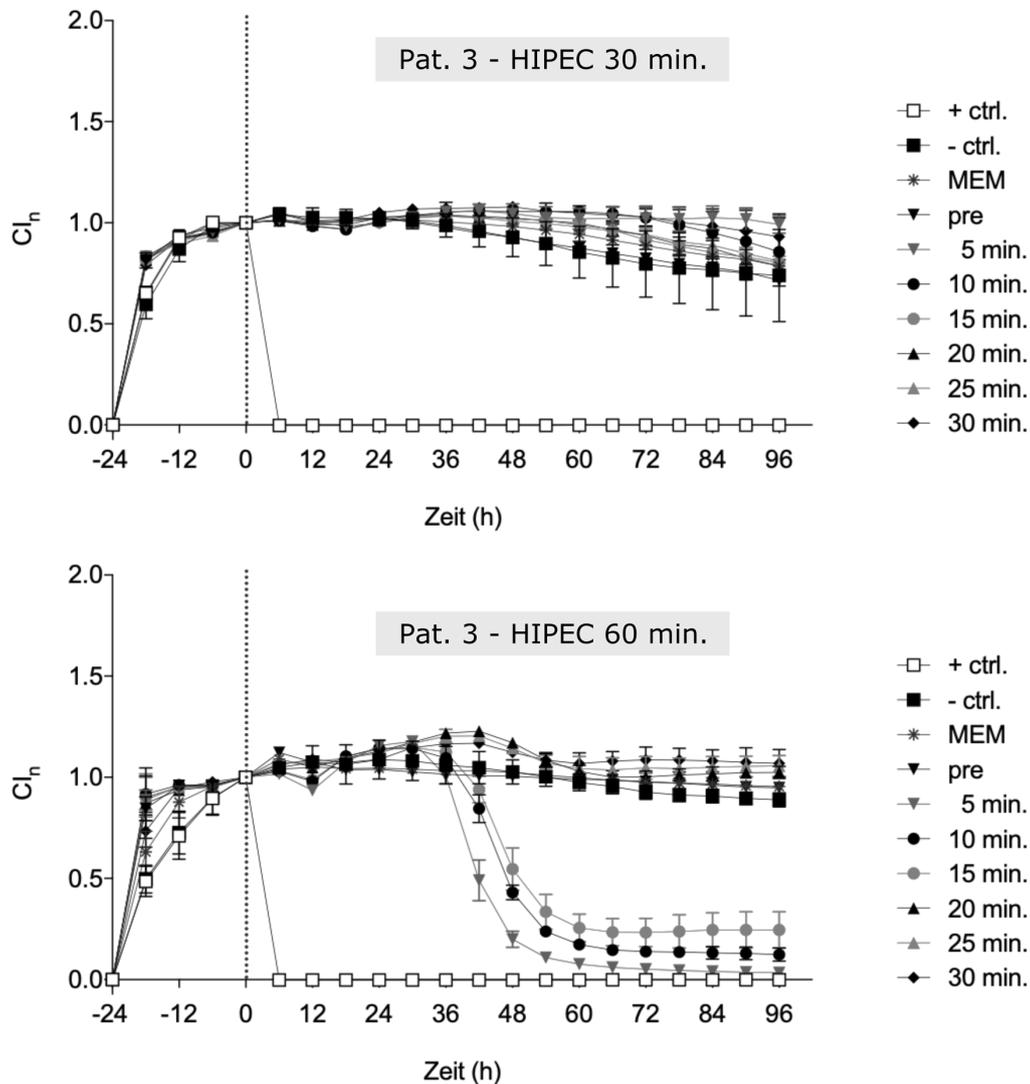


Abbildung 7: IPM von Patient 3, HIPEC 30/60 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten (obere Grafik) und 60 Minuten (untere Grafik), 42°C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.), MEM und IPM von Patient 3 (Pat. 3): pre, 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 96 Stunden.

Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-4.

Modifizierte Grafiken aus der Veröffentlichung: Seite 9, „Figure 2. Cell exposure for 30 or 60 minutes at 42°C in a time resolved in vitro model system using oxaliplatin-containing solutions (OCS) obtained from patients during HIPEC.“, a und b (Löffler et al. 2019).

Die Positivkontrollen (Triton X-100) haben einen direkten Zellverlust zur Folge, während die Negativkontrollen (PDS) und das MEM zu keiner Änderung der gemessenen Impedanz nach der 24-stündigen Kultivierung führen. Das gesamte IPM von Patient 3 zeigt nach der 30-minütigen HIPEC Simulation keinen Verlust der Zellviabilität auf, es lässt sich lediglich im zeitlichen Verlauf eine leichte Abnahme um das Niveau des $CI_n(0) = 1$ verzeichnen. Die Verlängerung der hyperthermen Behandlung auf eine Stunde führt bei den Proben 5 min., 10 min. und 15 min. zu einem zytotoxischen Effekt. In der grafischen Darstellung sind dabei die gegenseitigen Kurvenverläufe auf der Y-Achse verschoben.

Zu dem IPM von Patient 3 lässt sich resümieren, dass es eindeutige Unterschiede in der zellschädigenden Wirksamkeit der Proben in Bezug auf die hypertherme Expositionsdauer gibt (HIPEC 30 Minuten: 0 von 7 Proben gegenüber HIPEC 60 Minuten: 3 von 7 Proben).

3.1.3.3 IPM von Patient 7, HIPEC 30/60 Minuten

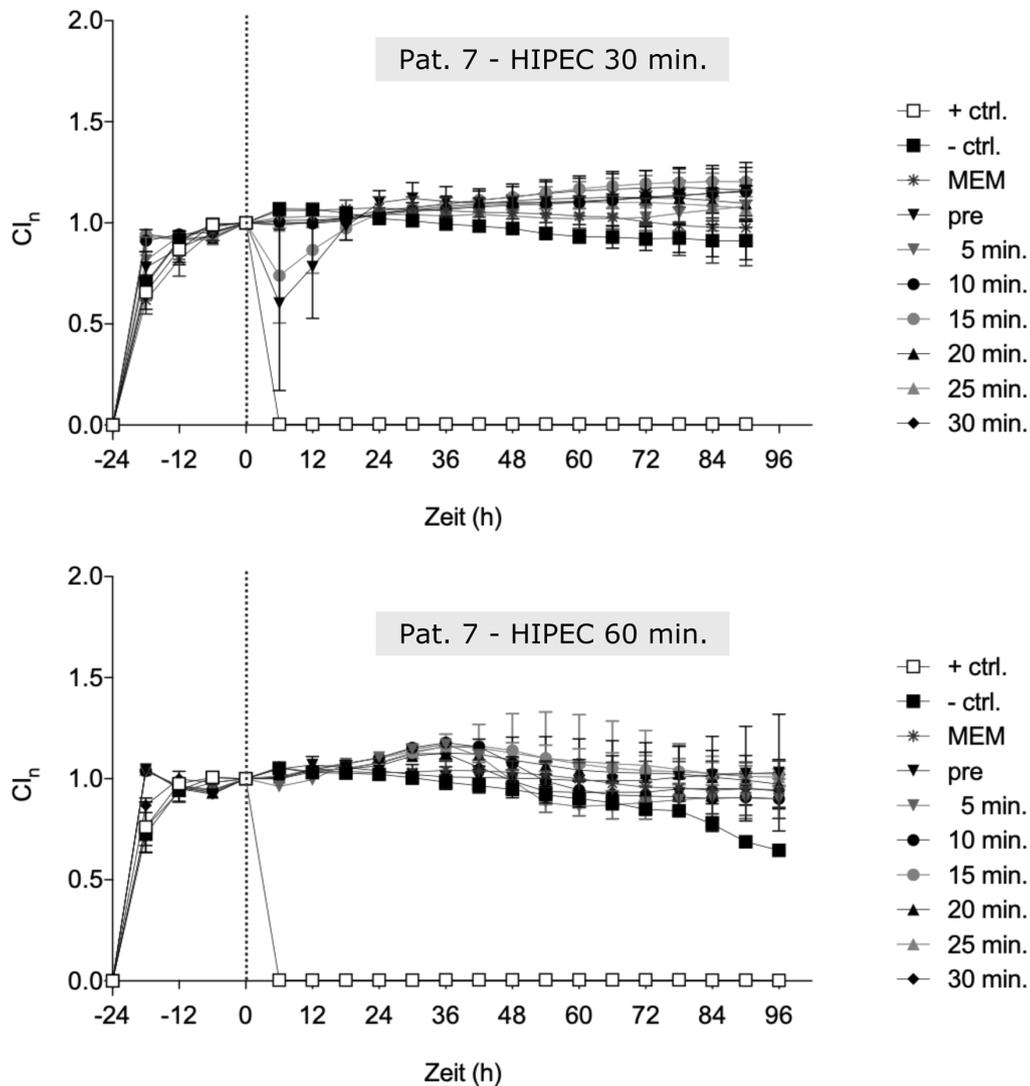


Abbildung 8: IPM von Patient 7, HIPEC 30/60 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten (obere Grafik) und 60 Minuten (untere Grafik), 42 °C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.), MEM und IPM von Patient 7 (Pat. 7): pre, 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 90 Stunden (obere Grafik) bzw. 96 Stunden (untere Grafik).

Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-6.

Modifizierte Grafiken aus dem Supplement der Veröffentlichung: Seite 8, „Suppl. Fig. 9 RTCA Pat. 7: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 30 minutes at 42 °C

ex vivo“ und „Suppl. Fig. 10 RTCA Pat. 7: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 60 minutes at 42 °C *ex vivo*“ (Löffler et al. 2019).

Aus den RTCA-Experimenten von Patient 7 lässt sich entnehmen, dass die Positivkontrollen (Triton X-100) nach beiden hyperthermen Behandlungen zu einem Abfall der gemessenen Impedanz auf das Nullniveau führen. Die Negativkontrollen (PDS), das MEM sowie das gesamte IPM hält sich hingegen für die ganze Versuchsdauer leicht fluktuierend um den $Cl_n(0) = 1$.

Somit lassen sich für alle Proben von Patient 7 keinerlei zellschädigende Aktivitäten sowohl bei der 30-minütigen als auch bei der einstündigen HIPEC Simulation zusammenfassen.

3.1.3.4 IPM der Patienten 2, 4-6, 8-9, HIPEC 30/60 Minuten

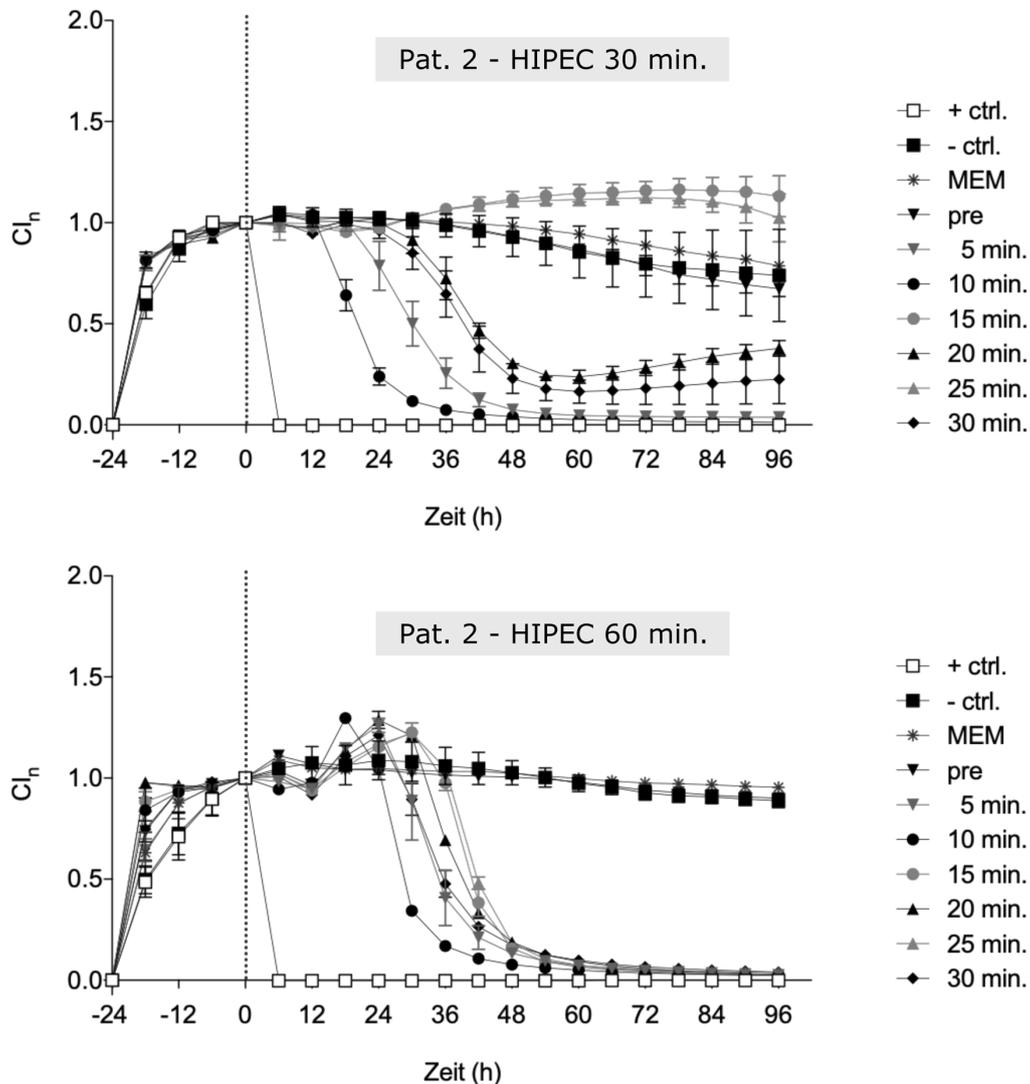


Abbildung 9: IPM von Patient 2, HIPEC 30/60 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten (obere Grafik) und 60 Minuten (untere Grafik), 42°C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.), MEM und IPM von Patient 2 (Pat. 2): pre, 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 96 Stunden. Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-4.

Modifizierte Grafiken aus dem Supplement der Veröffentlichung: Seite 4, „Suppl. Fig. 1 RTCA Pat. 2: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 30 minutes at 42°C ex vivo“ und „Suppl. Fig. 2 RTCA Pat. 2: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 60 minutes at 42°C ex vivo“ (Löffler et al. 2019).

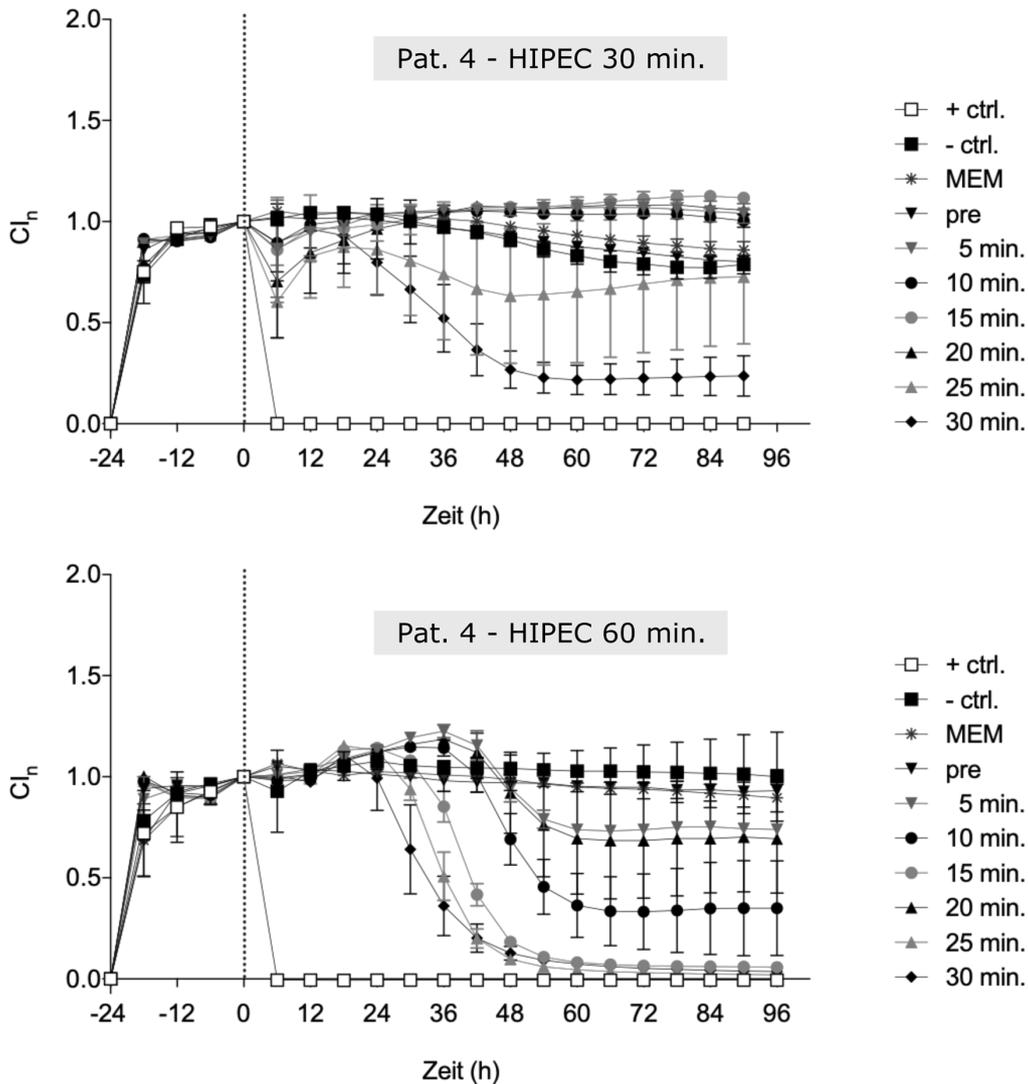


Abbildung 10: IPM von Patient 4, HIPEC 30/60 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten (obere Grafik) und 60 Minuten (untere Grafik), 42°C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.), MEM und IPM von Patient 4 (Pat. 4): pre, 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 90 Stunden (obere Grafik) bzw. 96 Stunden (untere Grafik).

Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-4.

Modifizierte Grafiken aus dem Supplement der Veröffentlichung: Seite 5, „Suppl. Fig. 3 RTCA Pat. 4: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 30 minutes at 42°C ex vivo“ und „Suppl. Fig. 4 RTCA Pat. 4: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 60 minutes at 42°C ex vivo“ (Löffler et al. 2019).

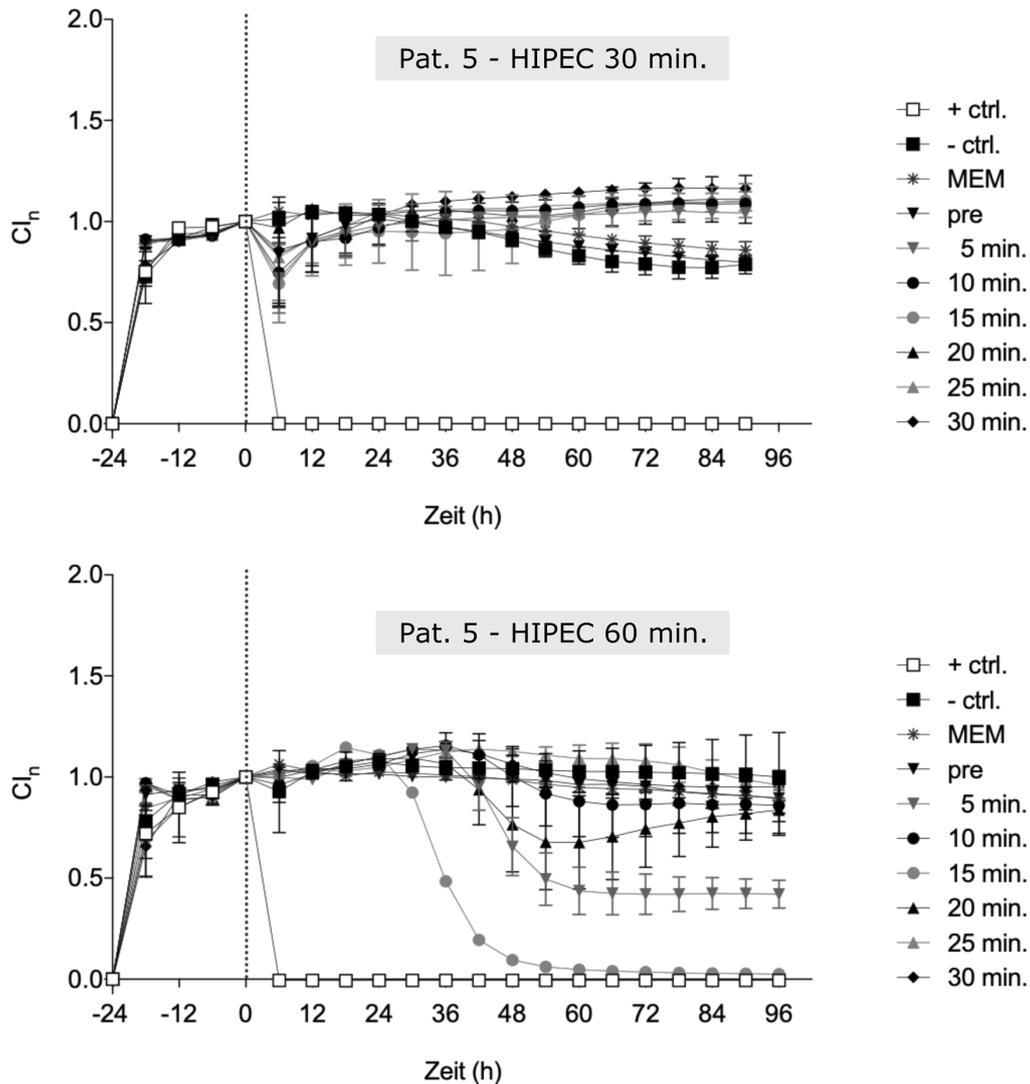


Abbildung 11: IPM von Patient 5, HIPEC 30/60 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten (obere Grafik) und 60 Minuten (untere Grafik), 42°C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.), MEM und IPM von Patient 5 (Pat. 5): pre, 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 90 Stunden (obere Grafik) bzw. 96 Stunden (untere Grafik).

Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-4.

Modifizierte Grafiken aus dem Supplement der Veröffentlichung: Seite 6, „Suppl. Fig. 5 RTCA Pat. 5: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 30 minutes at 42°C ex vivo“ und „Suppl. Fig. 6 RTCA Pat. 5: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 60 minutes at 42°C ex vivo“ (Löffler et al. 2019).

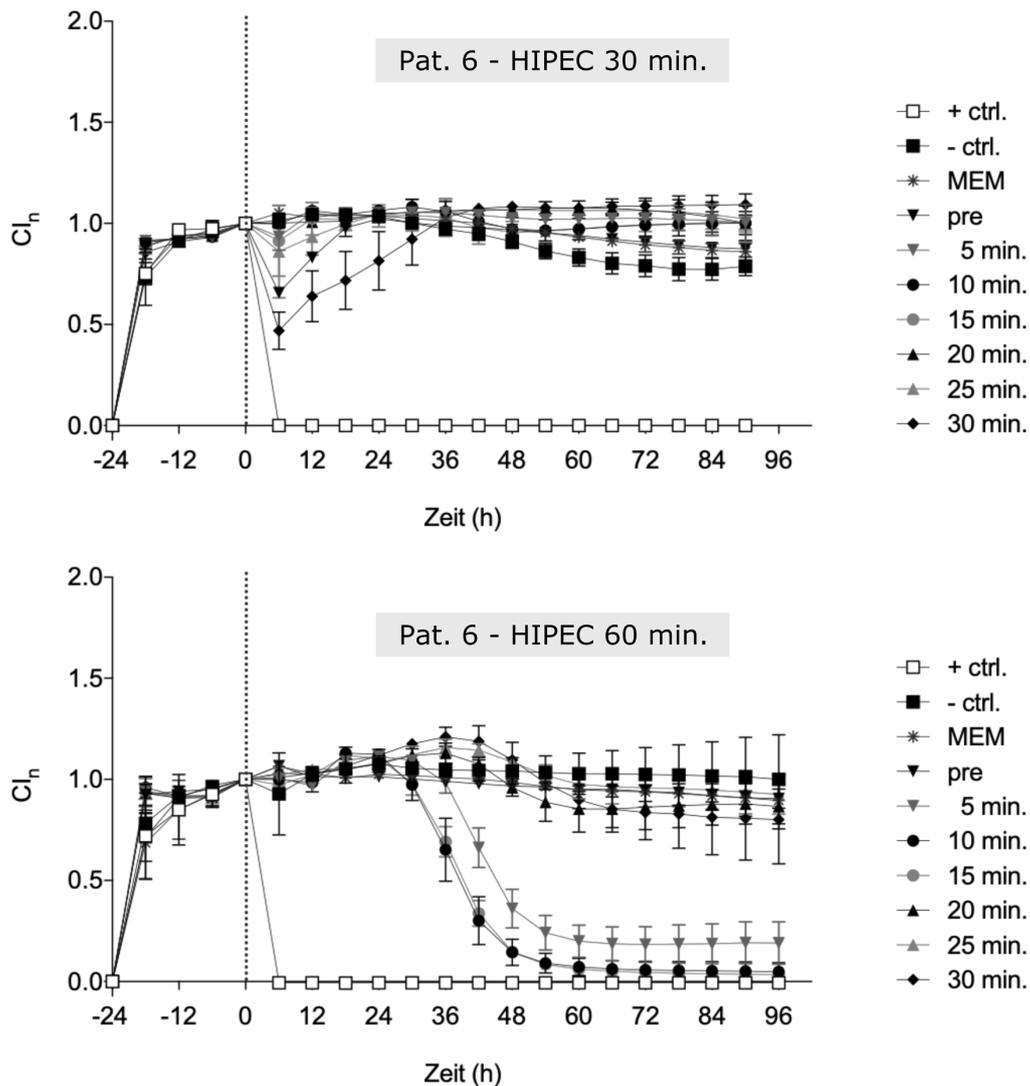


Abbildung 12: IPM von Patient 6, HIPEC 30/60 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten (obere Grafik) und 60 Minuten (untere Grafik), 42°C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.), MEM und IPM von Patient 6 (Pat. 6): pre, 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 90 Stunden (obere Grafik) bzw. 96 Stunden (untere Grafik).

Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-4.

Modifizierte Grafiken aus dem Supplement der Veröffentlichung: Seite 7, „Suppl. Fig. 7 RTCA Pat. 6: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 30 minutes at 42°C ex vivo“ und „Suppl. Fig. 8 RTCA Pat. 6: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 60 minutes at 42°C ex vivo“ (Löffler et al. 2019).

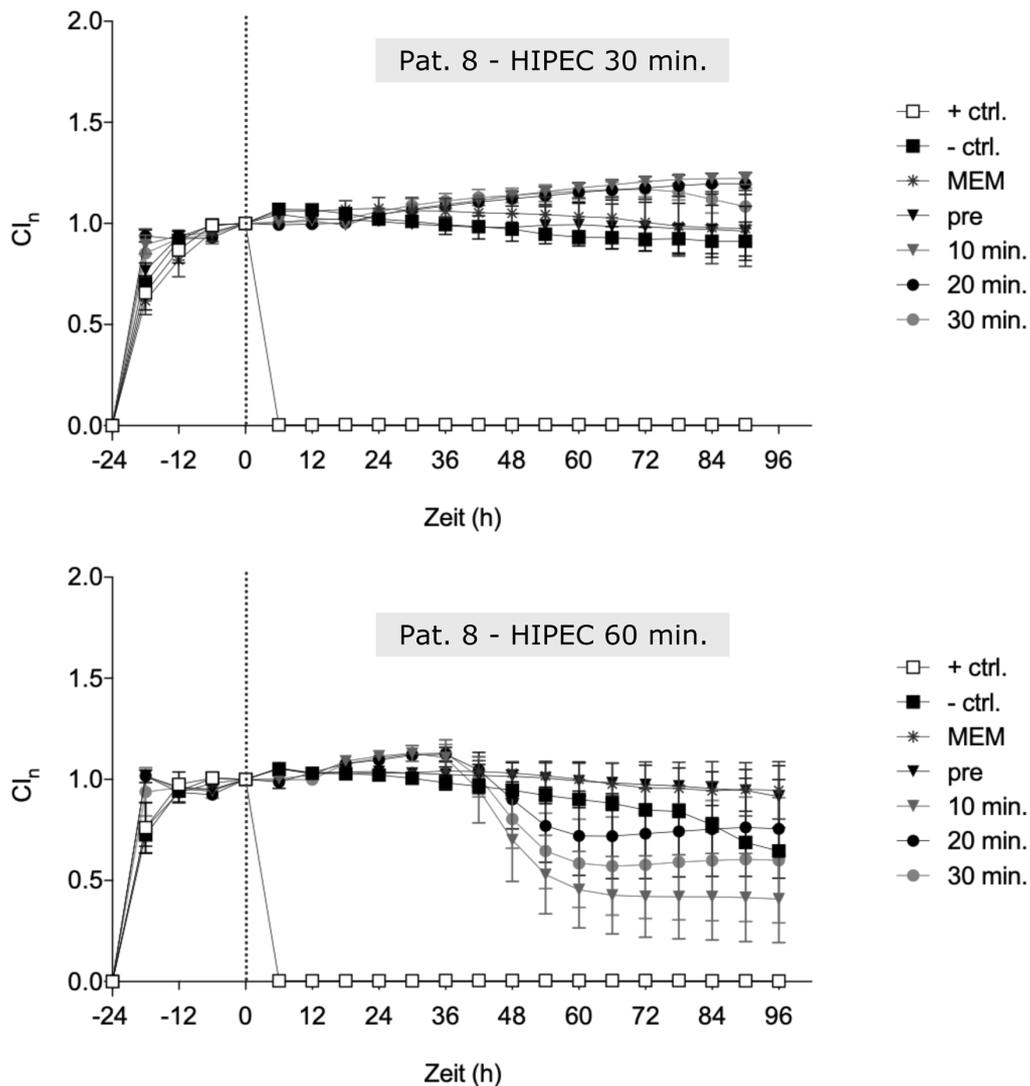


Abbildung 13: IPM von Patient 8, HIPEC 30/60 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten (obere Grafik) und 60 Minuten (untere Grafik), 42°C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.), MEM und IPM von Patient 8 (Pat. 8): pre, 10 min., 20 min. und 30 min.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 90 Stunden (obere Grafik) bzw. 96 Stunden (untere Grafik).

Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-6.

Modifizierte Grafiken aus dem Supplement der Veröffentlichung: Seite 9, „Suppl. Fig. 11 RTCA Pat. 8: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 30 minutes at 42°C ex vivo“ und „Suppl. Fig. 12 RTCA Pat. 8: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 60 minutes at 42°C ex vivo“ (Löffler et al. 2019).

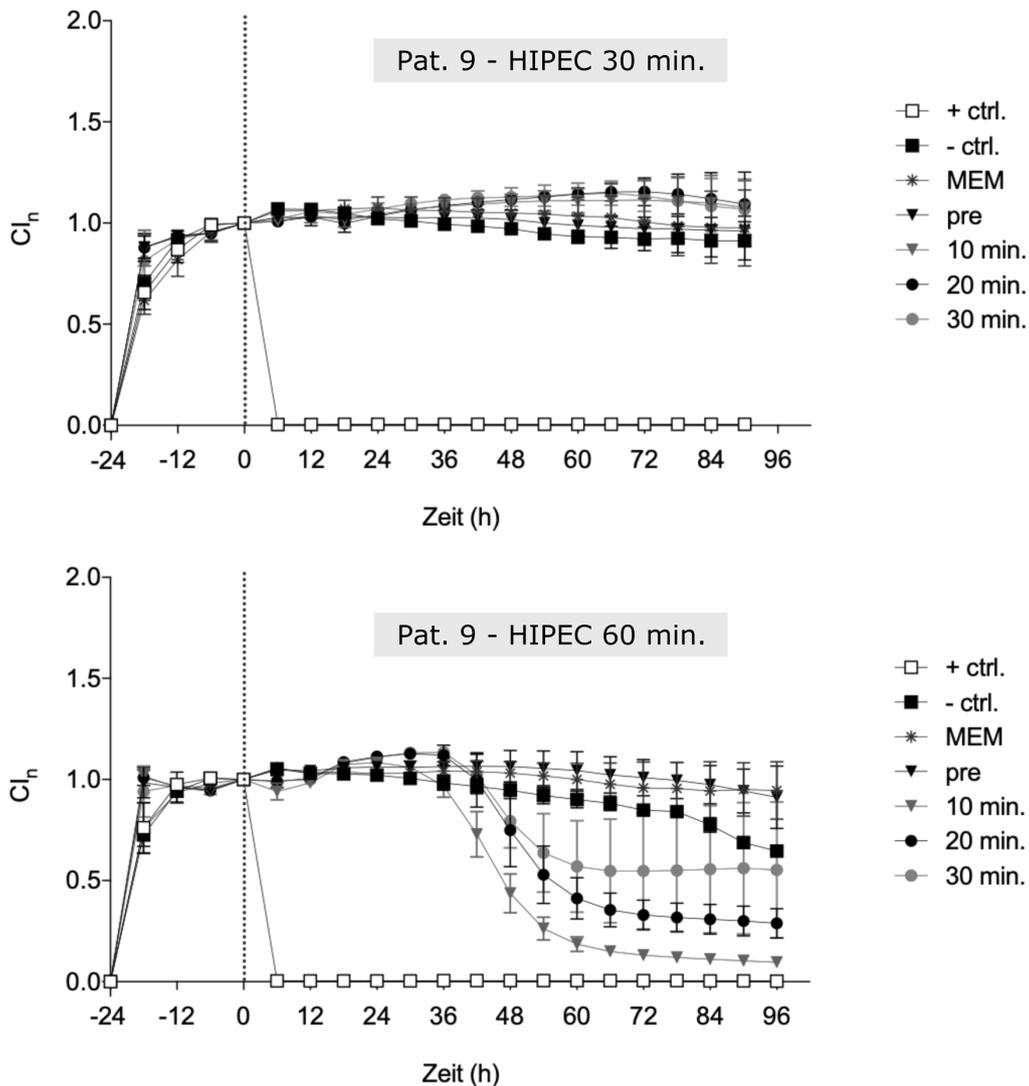


Abbildung 14: IPM von Patient 9, HIPEC 30/60 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten (obere Grafik) und 60 Minuten (untere Grafik), 42 °C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.), MEM und IPM von Patient 9 (Pat. 9): pre, 10 min., 20 min. und 30 min.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 90 Stunden (obere Grafik) bzw. 96 Stunden (untere Grafik).

Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert $Cl_n(0 h)$.

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-6.

Modifizierte Grafiken aus dem Supplement der Veröffentlichung: Seite 10, „Suppl. Fig. 13 RTCA Pat. 9: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 30 minutes at 42 °C ex vivo“ und „Suppl. Fig. 14 RTCA Pat. 9: Exposure of OAW-42 cells to OCS for 60 minutes at 42 °C ex vivo“ (Löffler et al. 2019).

3.1.4 IPM der Patienten 3-7, Langzeitversuche

Um eine mögliche Einflussnahme der langwierigen Lagerung des IPM in der AVT auf die Ergebnisse zu entkräften, wurden die nachgewiesenen zytotoxischen Eigenschaften der gesammelten Proben der Patienten 3-7 in Langzeitversuchen erneut validiert.

Tabelle 7: IPM der Patienten 3-7, Langzeitversuche (erste Zeitangabe $Cl_n < 0,5$) RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. Kontinuierliche Exposition mit hälftig MEM. Erste Zeitangabe in Stunden (h) und Minuten (min.) bei $Cl_n < 0,5$. Spalten: einzelne Patienten (Pat.) 3-7. Zeilen: jeweils dazugehörige Proben: pre, 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min. Anzahl der Replikate: 2-3.

IPM	Pat. 3	Pat. 4	Pat. 5	Pat. 6	Pat. 7
pre	-	-	-	-	-
5 min.	43 h 00 min.	32 h 15 min.	39 h 00 min.	33 h 45 min.	39 h 00 min.
10 min.	44 h 30 min.	27 h 00 min.	39 h 30 min.	37 h 15 min.	39 h 30 min.
15 min.	47 h 00 min.	31 h 00 min.	47 h 45 min.	37 h 45 min.	40 h 00 min.
20 min.	61 h 45 min.	30 h 15 min.	51 h 15 min.	38 h 00 min.	40 h 45 min.
25 min.	76 h 15 min.	30 h 45 min.	47 h 30 min.	39 h 00 min.	42 h 15 min.
30 min.	(-)	31 h 30 min.	52 h 30 min.	40 h 45 min.	43 h 30 min.

Bei dieser wiederholten Überprüfung konnte regelrecht die zellschädigende Wirkung von Oxaliplatin in dem IPM ein weiteres Mal bestätigt werden. Ausschließlich für die Probe 30 min. von Patient 3 wird vergleichsweise nur ein Rückgang des Cl_n auf knapp über die Hälfte nach Ablauf von 4 Tagen verzeichnet ($Cl_n(96\text{ h}) = 0,5092$). Für die Proben pre, die vor dem Hinzufügen des Chemotherapeutikums intraoperativ aus dem HIPEC Spülkreislauf gewonnen wurden, kann sich folglich auch kein zytotoxischer Effekt einstellen.

3.2 RTCA: in vitro hergestellte OCS, HIPEC 30/60 Minuten

3.2.1 Oxaliplatin in der PDS, HIPEC 30 Minuten

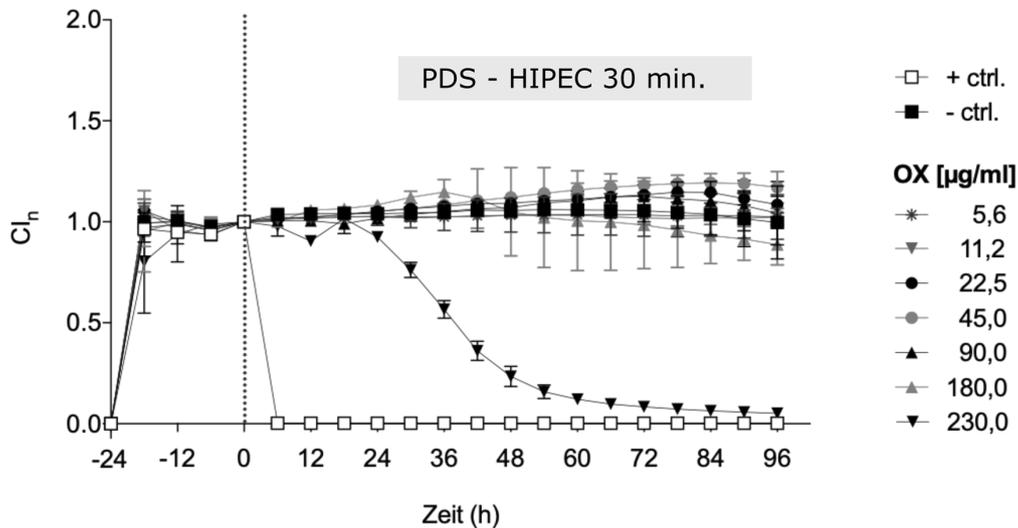


Abbildung 15: Oxaliplatin in der PDS, HIPEC 30 Minuten

RTCA-Experiment. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten, 42 °C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.) und in vitro hergestellte OCS in der PDS in den Konzentrationen 5,6 µg/ml, 11,2 µg/ml, 22,5 µg/ml, 45,0 µg/ml, 90,0 µg/ml, 180,0 µg/ml und 230,0 µg/ml.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 96 Stunden. Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert $Cl_n(0 h)$.

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-3.

Modifizierte Grafik aus der Veröffentlichung: Seite 12, „Figure 3. Cell exposure to oxaliplatin at 42 °C for 30 minutes in a time resolved in vitro model system.“, b (Löffler et al. 2019).

Die Positivkontrolle (Triton X-100) führt zu einem sofortigen Zelluntergang, während die Negativkontrolle (PDS) sowie die OCS in den Konzentrationen 5,6-180,0 µg/ml beständig das Niveau des $Cl_n(0) = 1$ halten. Lediglich für den in der offenen Operationstechnik gewählten Gehalt von 230,0 µg/ml ist bei der 30-minütigen HIPEC Simulation nach 18 Stunden ein gradueller Abfall der gemessenen Impedanz zu verzeichnen, spätestens nach 3 Tagen kann nur noch eine geringfügige Zellviabilität detektiert werden.

3.2.2 Oxaliplatin in der PDS, HIPEC 60 Minuten

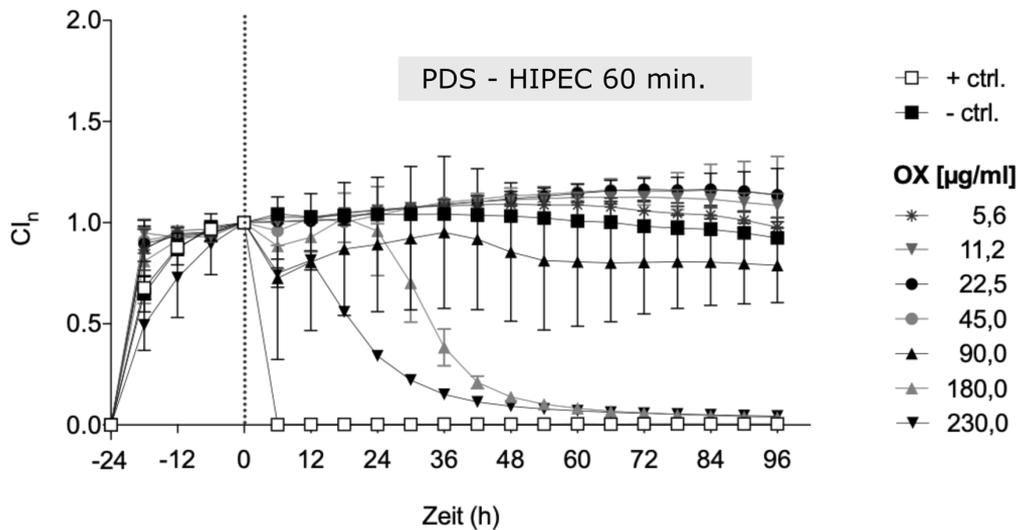


Abbildung 16: Oxaliplatin in der PDS, HIPEC 60 Minuten

RTCA-Experiment. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 60 Minuten, 42°C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.) und in vitro hergestellte OCS in der PDS in den Konzentrationen $5,6 \mu\text{g/ml}$, $11,2 \mu\text{g/ml}$, $22,5 \mu\text{g/ml}$, $45,0 \mu\text{g/ml}$, $90,0 \mu\text{g/ml}$, $180,0 \mu\text{g/ml}$ und $230,0 \mu\text{g/ml}$.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 96 Stunden. Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-3.

Modifizierte Grafik aus dem Supplement der Veröffentlichung: Seite 12, „Supp. Fig. 16 Oxaliplatin (OX)-spiked into PDS 60 minutes at 42°C “ (Löffler et al. 2019).

In dieser grafischen Darstellung deckt sich in etwa der jeweilige Kurvenverlauf der Positivkontrolle (Triton X-100), der Negativkontrolle (PDS) sowie der OCS in den Konzentrationen $5,6$ - $45,0 \mu\text{g/ml}$ mit dem bei der 30-minütigen HIPEC Simulation (s. 3.2.1). Für den Gehalt von $90,0 \mu\text{g/ml}$ (äquivalent zu dem IPM) bleibt die Aussagefähigkeit bei dem verlängerten hyperthermen Verfahren aufgrund des relativ hohen Fehlerbalkens vermindert. Dennoch zeigen die mittleren Messwerte einen initial geringen Verlust der Impedanz auf, die sich nach einer vorübergehenden Zunahme auf etwa einen $Cl_n = 0,8$ stabilisiert. Für die beiden Konzentrationen $180,0 \mu\text{g/ml}$ (geschlossene Operationstechnik) und $230,0 \mu\text{g/ml}$ lässt sich ein zytotoxischer Effekt nachweisen, nach ca. 2 Tagen nähert sich dabei die detektierte Zellviabilität der Nulllinie an.

3.2.3 Oxaliplatin in der PDS, Langzeitversuch

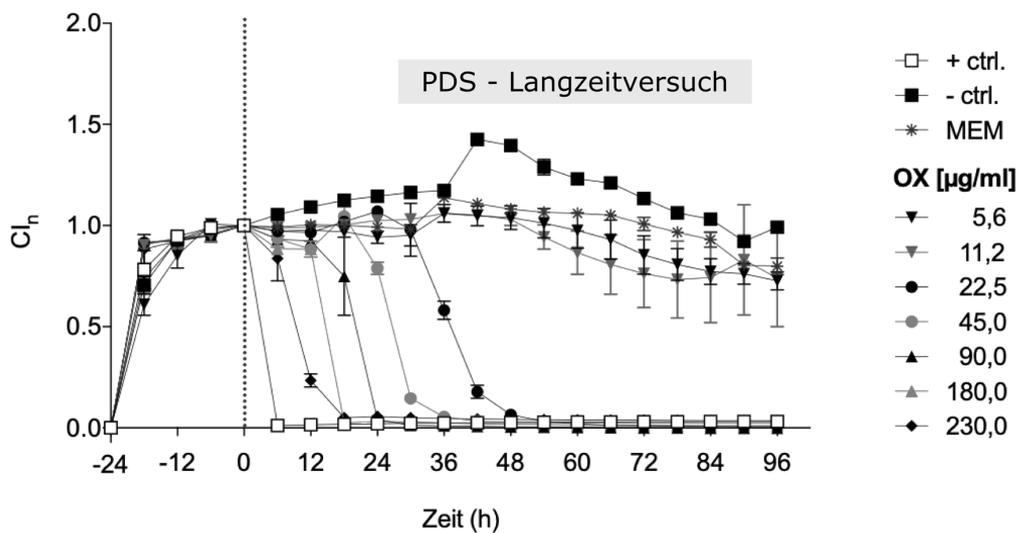


Abbildung 17: Oxaliplatin in der PDS, Langzeitversuch

RTCA-Experiment. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. Kontinuierliche Exposition mit hälftig MEM.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.), MEM und in vitro hergestellte OCS in der PDS in den Konzentrationen 5,6 $\mu\text{g/ml}$, 11,2 $\mu\text{g/ml}$, 22,5 $\mu\text{g/ml}$, 45,0 $\mu\text{g/ml}$, 90,0 $\mu\text{g/ml}$, 180,0 $\mu\text{g/ml}$ und 230,0 $\mu\text{g/ml}$.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 96 Stunden. Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert $Cl_n(0 \text{ h})$.

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-6.

Modifizierte Grafik aus dem Supplement der Veröffentlichung: Seite 13, „Supp. Fig. 17 Continuous exposure of OAW-42 cells to oxaliplatin (OX)-spiked into PDS“ (Löffler et al. 2019).

Die Positivkontrolle (Triton X-100) führt zu einem sofortigen Rückgang der Impedanz auf das Nullniveau. Die Negativkontrolle (PDS) sowie das MEM halten trotz eines kurzzeitig sprunghaften Kurvenverlaufs annähernd den Wert $Cl_n(0) = 1$ bei. Gleiches trifft für die OCS mit dem Gehalt von 5,6 $\mu\text{g/ml}$ und 11,2 $\mu\text{g/ml}$ zu. Im Gegensatz dazu kann für alle höher verwendeten Konzentrationen eine zytotoxische Wirkung gezeigt werden. Mit aufsteigender Dosierung von Oxaliplatin wird ein schnellerer Eintritt des Zellverlusts herbeigeführt, weswegen sich eine zeitliche Linksverschiebung auf der X-Achse beobachten lässt. Während die Konzentration 22,5 $\mu\text{g/ml}$ mit einem zellschädigenden Effekt nach etwa 2 Tagen assoziiert ist, wird ein vollständiger Verlust der gemessenen Impedanz bereits nach 18 Stunden bei dem höchsten Gehalt von 230,0 $\mu\text{g/ml}$ deutlich.

3.2.4 Oxaliplatin in der D5W, HIPEC 30 Minuten

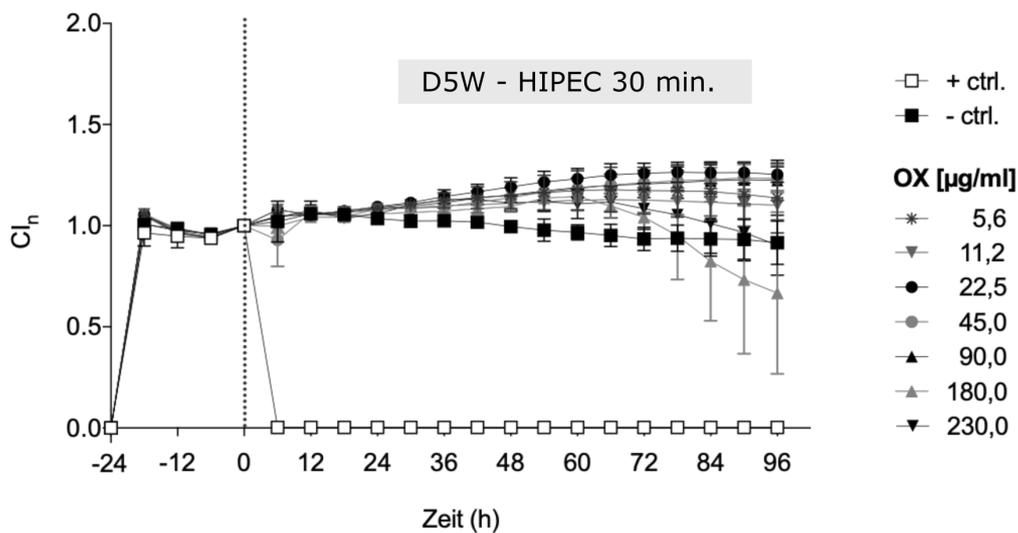


Abbildung 18: Oxaliplatin in der D5W, HIPEC 30 Minuten

RTCA-Experiment. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten, 42 °C und 50 rpm.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.) und in vitro hergestellte OCS in der D5W in den Konzentrationen 5,6 µg/ml, 11,2 µg/ml, 22,5 µg/ml, 45,0 µg/ml, 90,0 µg/ml, 180,0 µg/ml und 230,0 µg/ml.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 96 Stunden. Y-Achse: Cl_n, gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-3.

Modifizierte Grafik aus der Veröffentlichung: Seite 12, „Figure 3. Cell exposure to oxaliplatin at 42 °C for 30 minutes in a time resolved in vitro model system.“, a (Löffler et al. 2019).

Die Positivkontrolle (Triton X-100) weist einen kompletten Zellverlust auf. Demgegenüber führt die Negativkontrolle (D5W) zu keiner Änderung der detektierten Impedanz nach der 24-stündigen Kultivierung. Für die Konzentrationen 5,6-90,0 µg/ml lässt sich innerhalb der 4-tägigen Messung allmählich ein geringer Anstieg um maximal einen $Cl_n = 0,2524$ verzeichnen. Für die Dosierung von 230,0 µg/ml trifft dies zunächst ebenfalls zu, jedoch ist nach 72 Stunden ein Abwärtstrend zu registrieren. Die stärkste Varianz ist bei dem Gehalt von 180,0 µg/ml wahrzunehmen. Nach einem ähnlichen Kurvenverlauf fällt die Impedanz mit einem zunehmenden Fehlerbalken auf den Cl_n (96 h) = 0,6666 ab.

Für die OCS in der D5W lässt sich somit festhalten, dass ein Unterschreiten der 50%igen Zellviabilität insgesamt nicht erreicht wird.

3.2.5 Oxaliplatin in der D5W, HIPEC 60 Minuten

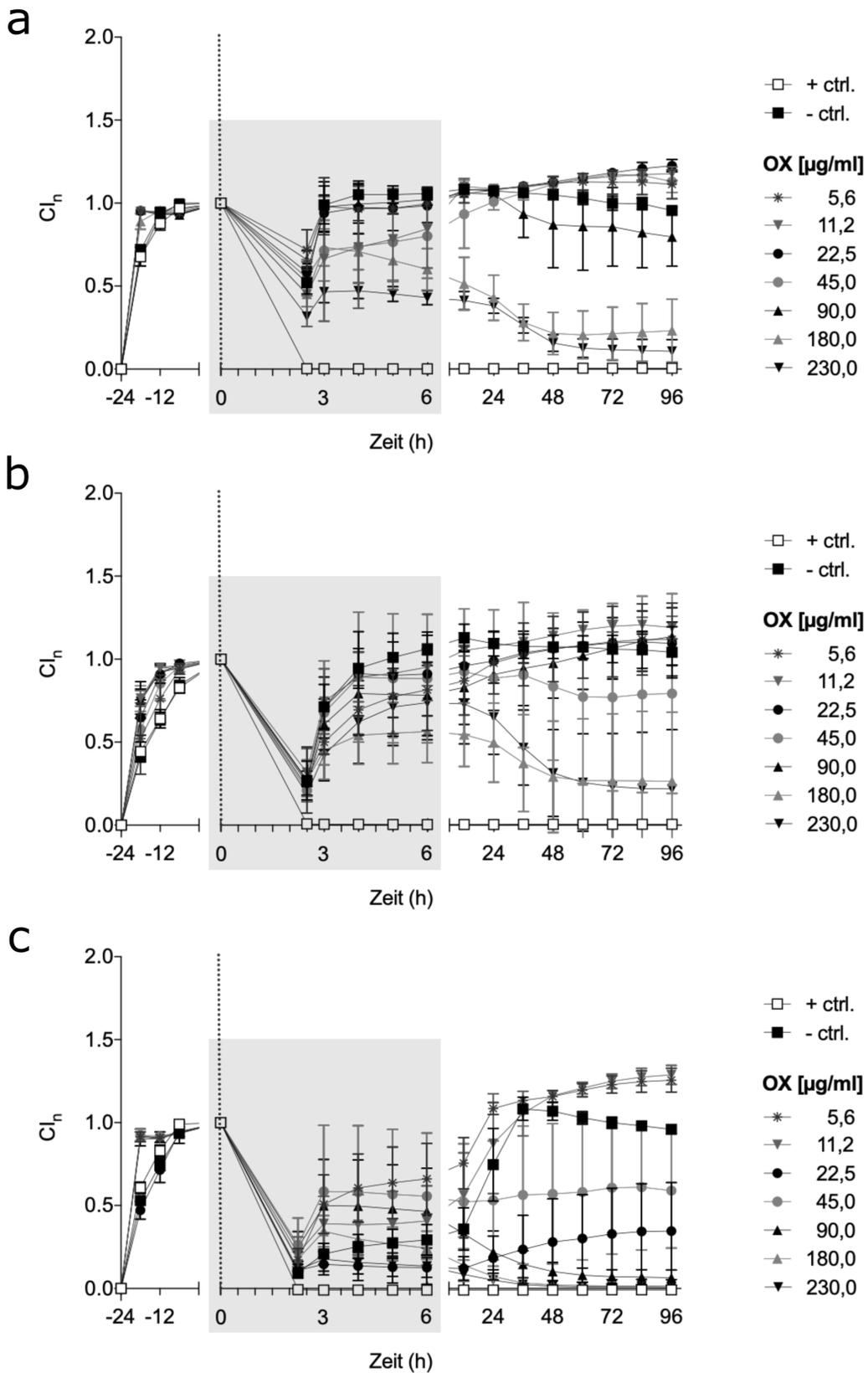


Abbildung 19: Oxaliplatin in der D5W, HIPEC 60 Minuten

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 60 Minuten, 42 °C und 50 rpm (a-c).

Rechtsseitige Legende: jeweils Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.) und in vitro hergestellte OCS in der D5W in den Konzentrationen 5,6 µg/ml, 11,2 µg/ml, 22,5 µg/ml, 45,0 µg/ml, 90,0 µg/ml, 180,0 µg/ml und 230,0 µg/ml.

X-Achse: jeweils Zeit in Stunden (h), variierendes stündliches Intervall, Gesamtlaufzeit 96 Stunden, skalenvergrößerter Bereich von 0-6 Stunden (grau kolorierte Hinterlegung).

Y-Achse: jeweils Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-6.

Auffällig ist bei diesen 3 unabhängigen RTCA-Experimenten in einer jeweils modifizierten Versuchsmethodik die erste Messung direkt nach der 60-minütigen HIPEC Simulation, da für die überwiegenden OCS ein initialer Abfall des Cl_n um weitaus über die Hälfte nachgewiesen wird. Im weiteren zeitlichen Verlauf fällt die detektierte Impedanz entweder auf Werte nahe der Nulllinie zurück oder steigt in etwa auf das Ausgangsniveau nach der 24-stündigen Kultivierung wieder an. Infolgedessen ist generell eine Auswertung nicht möglich.

3.2.6 Oxaliplatin in der D5W, Langzeitversuch

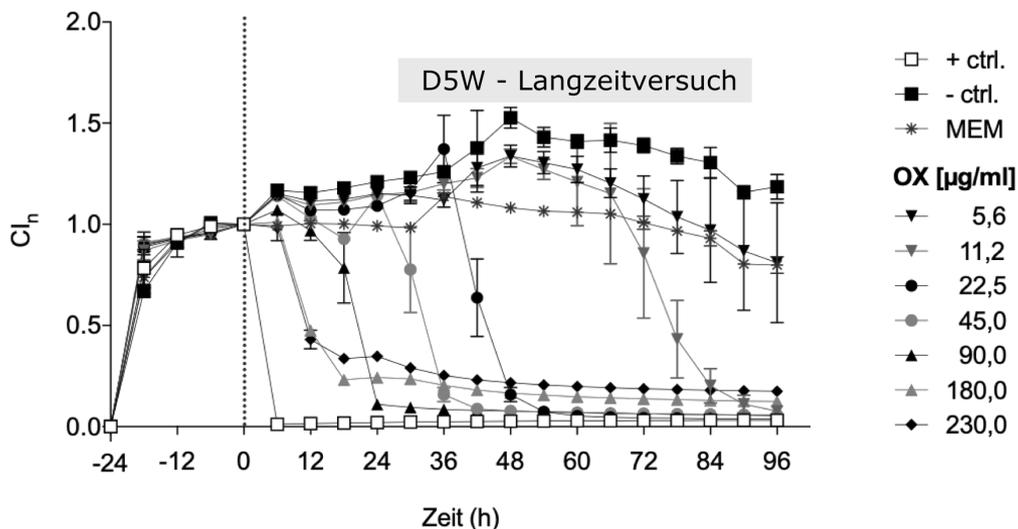


Abbildung 20: Oxaliplatin in der D5W, Langzeitversuch

RTCA-Experiment. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der E-Plate 96. Kontinuierliche Exposition mit hälftig MEM.

Rechtsseitige Legende: Positivkontrolle (+ ctrl.), Negativkontrolle (- ctrl.), MEM und in vitro hergestellte OCS in der D5W in den Konzentrationen 5,6 µg/ml, 11,2 µg/ml, 22,5 µg/ml, 45,0 µg/ml, 90,0 µg/ml, 180,0 µg/ml und 230,0 µg/ml.

*X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 96 Stunden.
Y-Achse: CI_n , gestrichelte Vertikale markiert $CI_n (0 h)$.
Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-6.
Modifizierte Grafik aus dem Supplement der Veröffentlichung: Seite 14, „Supp. Fig. 18 Continuous exposure of OAW-42 cells to oxaliplatin (OX)-spiked into D5W“ (Löffler et al. 2019).*

Die Positivkontrolle (Triton X-100) führt zu einem sofortigen Rückgang der Impedanz auf das Nullniveau. Die Negativkontrolle (D5W), das MEM sowie die OCS in der Dosierung von 5,6 $\mu\text{g/ml}$ halten sich um den $CI_n (0) = 1$, wenn auch mit wechselhaften Phasen des Kurvenverlaufs. Für die OCS in den restlichen Konzentrationen 11,2-230,0 $\mu\text{g/ml}$ kann jeweils ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. Generell wird mit einem steigenden Gehalt an Oxaliplatin der Abfall der gemessenen Impedanz zunehmend früher eingeleitet. Für die beiden Dosierungen von 180,0 $\mu\text{g/ml}$ und 230,0 $\mu\text{g/ml}$ ist nach ca. 12 Stunden das Absinken des $CI_n < 0,5$ ersichtlich. Dieser pendelt sich bei rund 1/4 des Werts nach der 24-stündigen Kultivierung linear ein, ein vollständiger Verlust der Zellviabilität kann nicht belegt werden.

In der direkten Gegenüberstellung zu den Langzeitversuchen der *in vitro* hergestellten OCS in der PDS (s. 3.2.3) stimmen diese zytotoxischen Effekte für alle Konzentrationen überein, lediglich bei dem Gehalt von 11,2 $\mu\text{g/ml}$ des Chemotherapeutikums in der D5W lässt sich zusätzlich eine zellschädigende Wirkung verzeichnen.

3.2.7 PIT (extern): CTB und SRB, HIPEC 30 Minuten und Langzeitversuch

Die dargelegten Ergebnisse der RTCA-Experimente sind durch 2 unabhängige Versuche (CTB und SRB) vom PIT validiert worden. Es wurde hierzu kein Eigenanteil geleistet, allerdings sollen die Auswertungen in den Kontext dieser Dissertation als zusätzliche Überprüfung der selbsterhobenen Resultate miteinbezogen werden.

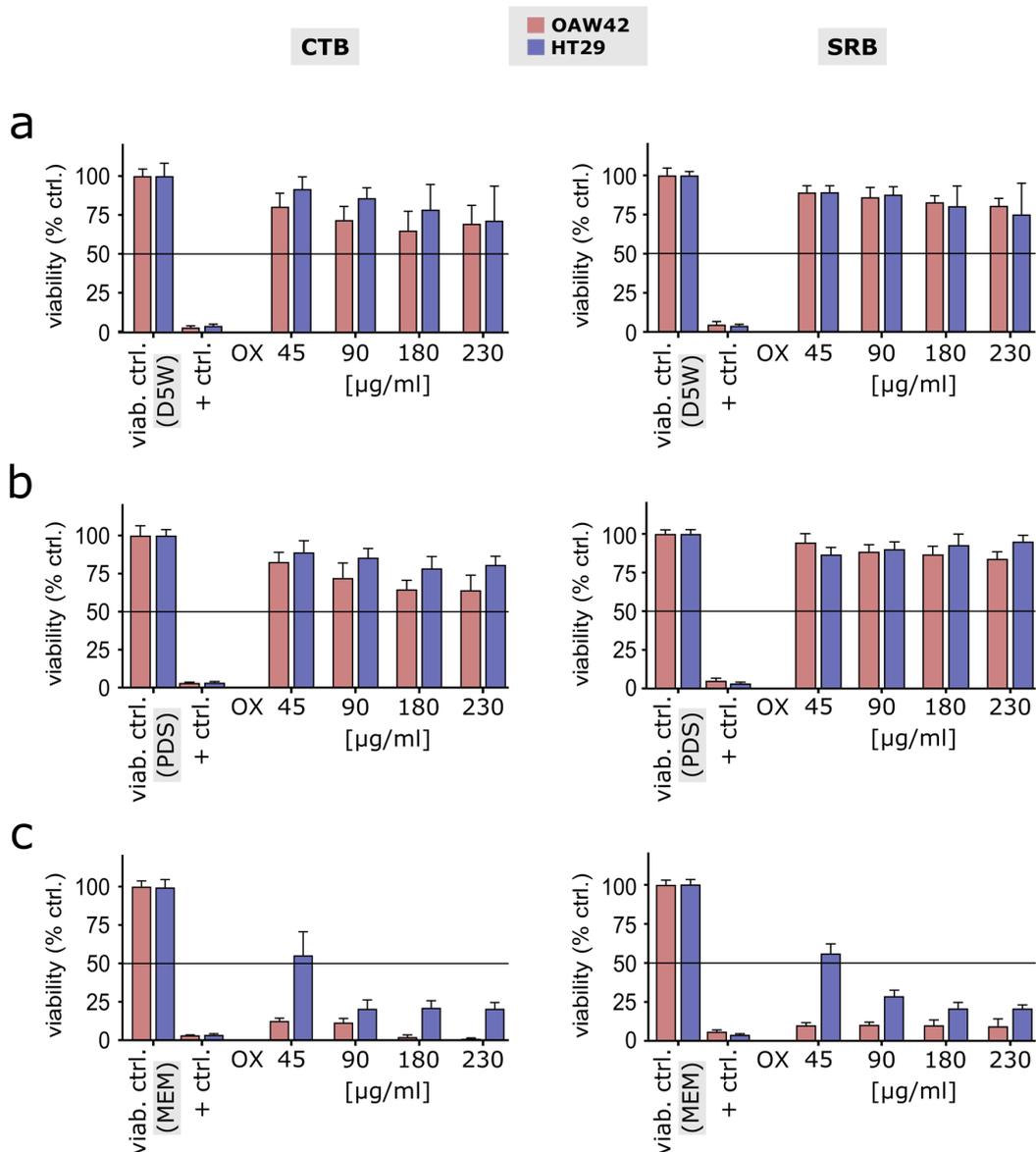


Abbildung 21: PIT (extern): CTB und SRB, HIPEC 30 Minuten und Langzeitversuch

Versuche durch das PIT (keine eigenständige Datenerhebung): CTB (linke Grafiken) und SRB (rechte Grafiken). Experimente an je 2 unterschiedlichen Zelllinien (Legende oberhalb): ovarielle Tumorzellen OAW42 (rote

Kolorierungen) sowie CRC-Zelllinie HT29 (blaue Kolorierungen). Modellsystem mit $3,15 \times 10^5$ Zellen pro Well in der 24-Well-Platte. HIPEC Simulation: 30 Minuten, 42 °C (a und b) und kontinuierliche Exposition für 72 Stunden (c).

X-Achse: normierte Kontrolle der Zellviabilität (viab. ctrl.), Positivkontrolle (+ ctrl.) und in vitro hergestellte OCS in der D5W (a), der PDS (b) sowie in MEM (c) jeweils in den Konzentrationen 45,0 µg/ml, 90,0 µg/ml, 180,0 µg/ml und 230,0 µg/ml.

Y-Achse: Prozent der Zellviabilität (viability % ctrl.), schwarze Waagrechte markiert 50 %.

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Verwendung von Triplikaten in 3 unabhängigen Experimenten.

Modifizierte Grafiken aus der Veröffentlichung: Seite 14, „Figure 4. Cell death after incubation of OAW-42 and HT29 cells with OX spiked into dextrose 5 % in water (D5W) or peritoneal dialysis solution (PDS) for 30 minutes at 42 °C and continuous exposure measured by end point assays.“, a-c (Löffler et al. 2019).

In den grafischen Darstellungen zeigt die Positivkontrolle stets eine Abnahme der Zellviabilität auf wenige Prozente. Für die OCS in der D5W und in der PDS in den Konzentrationen 45,0-230,0 µg/ml kann sowohl der CTB als auch SRB für beide Zelllinien nach der 30-minütigen HIPEC Simulation im Mittel kein Unterschreiten der 50 % Marke nachweisen. Für die Langzeitversuche mit den OAW42 Zellen lassen sich hingegen für alle Dosierungen in MEM eine Zytotoxizität belegen. Bei der kontinuierlichen Exposition mit der CRC-Zelllinie HT29 trifft dies ebenfalls zu, allerdings erst ab der Konzentration 90,0 µg/ml und mit einer vergleichsweise schwächeren Sensitivität auf das Pharmakon.

3.3 Messung der pH-Werte

Tabelle 8: Messung der pH-Werte

Messung der pH-Werte mittels Glaselektrode nach vorangegangener Kalibrierung. Endpunkt automatisch strikt oder manuell standardisiert nach Ablauf von einer Minute.

Spalten: IPM: pre, 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min. sowie in vitro hergestellte OCS in den Konzentrationen 11,2 µg/ml, 22,5 µg/ml, 45,0 µg/ml, 90,0 µg/ml, 180,0 µg/ml, 360,0 µg/ml und 460,0 µg/ml.

Zeilen: einzelne Patienten (Pat.) 1-9, MEM, PDS, D5W sowie OCS in der PDS und der D5W.

IPM	pre	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.	30 min.
Pat. 1	8,73	8,38	8,55	8,55	8,62	8,38	8,87
Pat. 2	8,85	8,72	8,59	8,65	8,62	8,93	8,42
Pat. 3	8,71	8,59	8,57	8,45	8,84	8,62	8,58
Pat. 4	8,80	8,65	8,76	8,85	8,74	8,64	8,59
Pat. 5	8,51	8,47	8,72	8,57	8,44	8,69	8,47
Pat. 6	8,58	8,48	8,47	8,48	8,53	8,58	8,68
Pat. 7	8,51	8,31	8,48	8,38	8,43	8,29	8,29
Pat. 8	8,70		8,93		8,89		8,60
Pat. 9	8,91		8,83		8,85		8,64
MEM	7,67						
PDS	8,34						
D5W	5,09						
OX [µg/ml]	11,2	22,5	45,0	90,0	180,0	360,0	460,0
OCS PDS	8,46	8,52	8,51	8,50	8,52	8,44	8,47
OCS D5W	4,50	4,50	4,52	4,55	4,58	4,63	4,67

Für das IPM der 9 Patienten ergeben sich sowohl interindividuell als auch innerhalb der entnommenen Zeitkinetik keine maßgeblichen Unterschiede, die Werte liegen alle in einer Spanne von pH = 8,29-8,93. Die Kontrolle mit dem MEM ist in einem annähernd physiologischen Bereich. Für die PDS kann eine Mittelung der Proben insgesamt einen alkalischen pH-Wert nachweisen, während die Messungen von der D5W vergleichsweise in einem sauren Milieu liegen. Auffallend ist hierbei eine strenge Korrelation: für die in vitro hergestellten OCS in der D5W wird mit der zunehmenden Konzentration von Oxaliplatin der pH-Wert schrittweise basischer.

3.4 AAS (extern): in vitro hergestellte OCS, HIPEC 30/60 Minuten

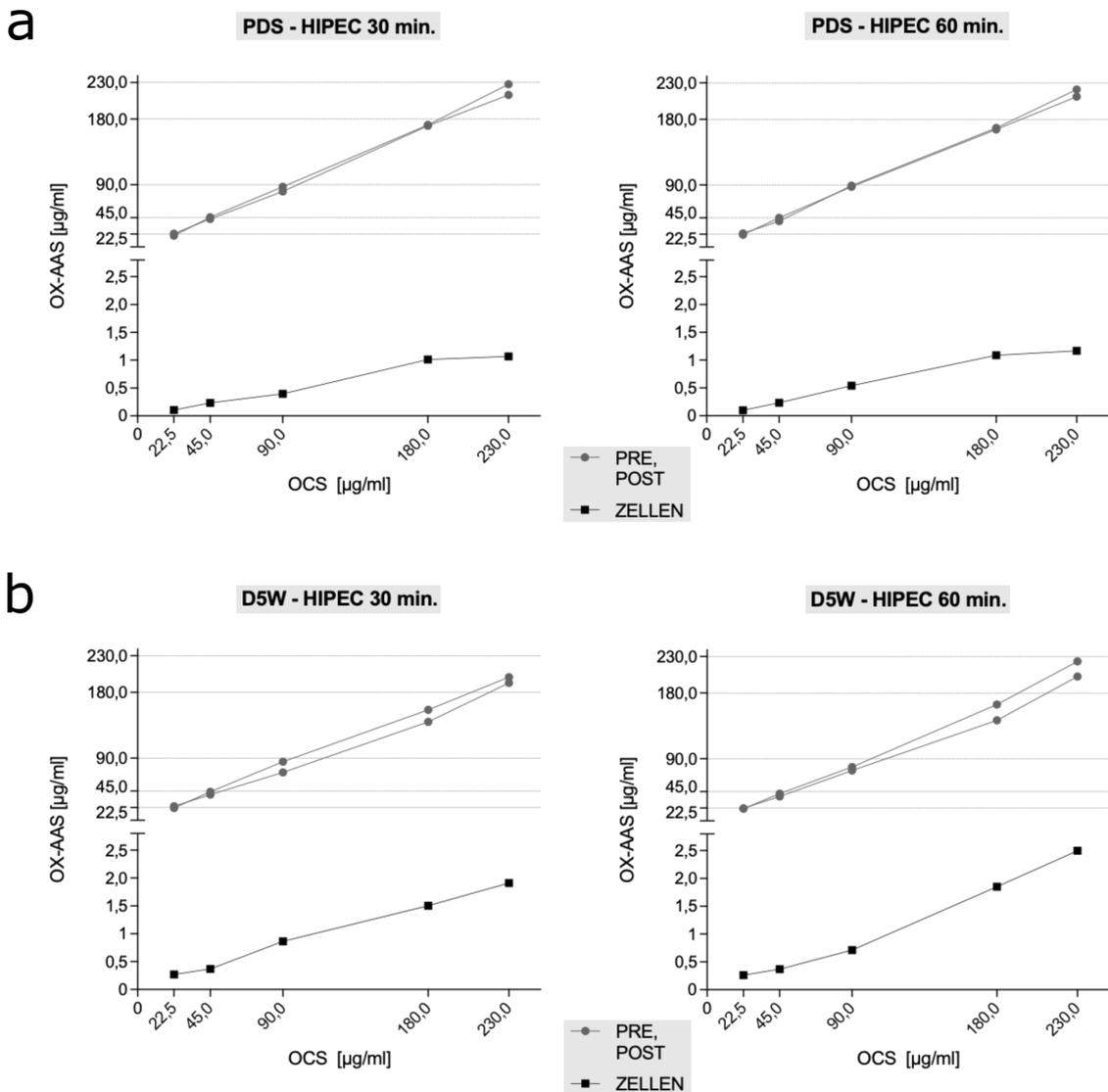


Abbildung 22: AAS (extern): in vitro hergestellte OCS, HIPEC 30/60 Minuten

AAS des Platingehalts mittels Grafitrohr, externe Analytik durch das MVZ Dr. Eberhard & Partner Dortmund (Auftragsnummer: STUD-2019-028). Die Validationsdaten für die Präzision der AAS-Methodik sind durch den mittleren Variationskoeffizienten des Intra-Assay ermittelt worden.

Proben PRE = 2 ml der initialen Lösungen, nach der HIPEC Simulation (42 °C und 120 rpm) für 30 Minuten (linke Grafiken) und 60 Minuten (rechte Grafiken): Proben POST = 4 ml Überstand (nach vorheriger Zentrifugation) und Proben ZELLEN = Pellet aus $10,0 \times 10^6$ OAW42 Zellen in 2 ml Triton X-100 (nach vorherigem Waschschrift mit DPBS und einer Zentrifugation).

X-Achse: in vitro hergestellte OCS in der PDS (a) und der D5W (b) jeweils in den Konzentrationen 22,5 $\mu\text{g/ml}$, 45,0 $\mu\text{g/ml}$, 90,0 $\mu\text{g/ml}$, 180,0 $\mu\text{g/ml}$ und 230,0 $\mu\text{g/ml}$.

Y-Achse: externe AAS-Messdaten des Platingehalts (OX-ASS), skalenadaptiert für die Proben PRE, POST (in den Grafiken oberhalb) und für die Proben ZELLEN (in den Grafiken unterhalb).

Die extern ermittelten AAS-Messdaten des Platingehalts liegen jeweils für die beiden Kontrollen (PDS und D5W) unter der Nachweisgrenze. Allgemein ergibt sich für die analysierten Konzentrationen der OCS in der PDS im Vergleich zu der D5W jeweils eine geringere Abweichung zu den errechneten Zielwerten. Grundsätzlich haben die Proben POST der in vitro hergestellten OCS in der PDS einen höheren Gehalt des Platinderivats als die initialen Proben PRE. Ausnahmen stellen dabei lediglich die Konzentrationen 22,5 µg/ml bei der halbstündigen HIPEC sowie 45,0 µg/ml bei der 60-minütigen HIPEC dar. Gegensätzlich verhält es sich für die Dosierungen in der D5W, bei denen die Werte der Proben PRE überwiegend über denen der Proben POST liegen. Abweichungen hiervon sind für die Konzentration 22,5 µg/ml bei beiden hyperthermen Verfahren ermittelt worden. Auffallende Differenzen zu dem angestrebten Gehalt des Platinderivats in den OCS ergeben sich v. a. für die klinischen Dosierungen von 180,0 µg/ml und 230,0 µg/ml. Während für die Lösungen mit einem geringen Gehalt an Oxaliplatin verhältnismäßig exakte Konzentrationen nachgewiesen werden, heben sich diese insbesondere für D5W in den höher dosierten OCS ab. In diesem Zusammenhang darf tendenziell nicht eine Schwäche der übermittelten AAS-Messdaten ungenannt bleiben, da für die exakt identischen Lösungen teils ein abweichender Gehalt an Platin analysiert wurde.

Die Resultate für die Proben ZELLEN weisen insgesamt nur einen geringen Prozentsatz der ursprünglich eingesetzten Dosierungen des Chemotherapeutikums nach. In der Gesamtbetrachtung lässt sich ein Zusammenhang zwischen zunehmenden Konzentrationen der OCS und einem vermehrt nachgewiesenen Gehalt an Oxaliplatin in den Proben aufzeigen. Für die D5W ist dieser Effekt deutlicher ausgeprägt als für die PDS und insbesondere für die höheren Dosierungen verstärkt erkennbar.

3.5 Durchflusszytometrie: OAW42 Zellen, HIPEC 30/60 Minuten

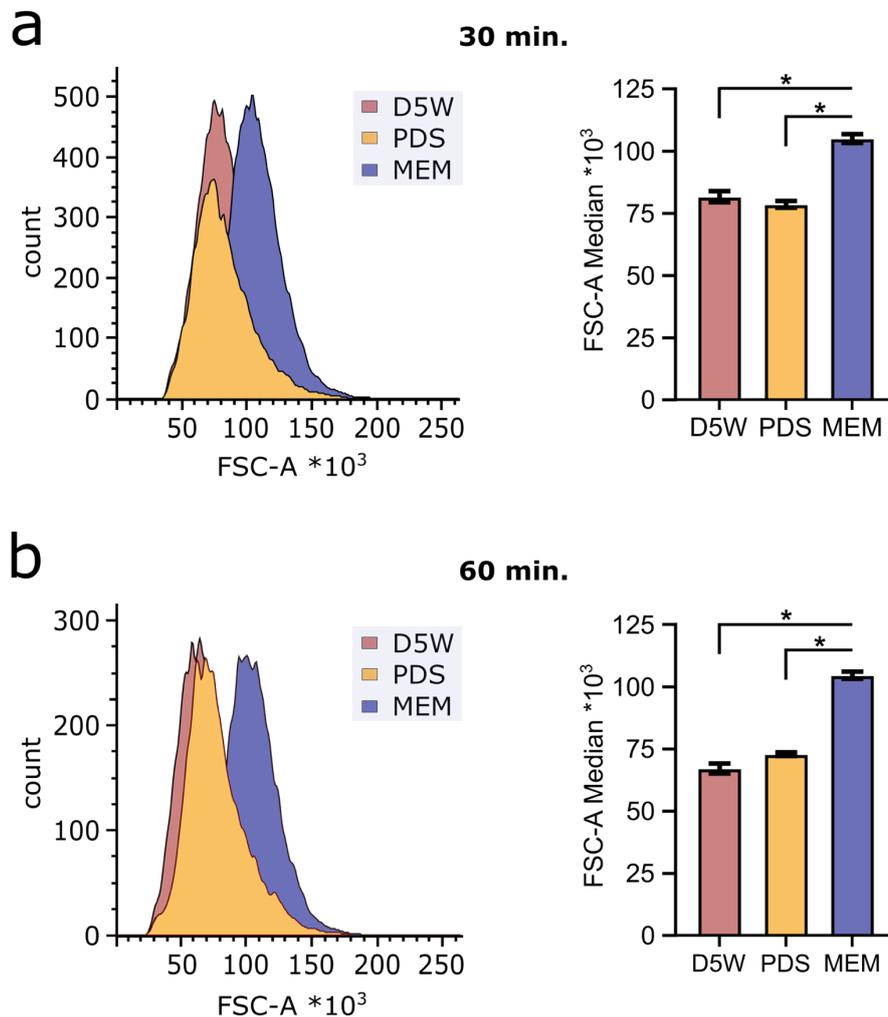


Abbildung 23: Durchflusszytometrie: OAW42 Zellen, HIPEC 30/60 Minuten

Durchflusszytometrie. Modellsystem mit $10,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen pro Well in der 96-Well-Platte. HIPEC Simulation: 30 Minuten (a) und 60 Minuten (b), 42 °C und 30 rpm in der D5W (rote Kolorierungen), in der PDS (gelbe Kolorierungen) sowie in MEM (blaue Kolorierungen).

X-Achse: FSC-A × (*) 10³ (linke Grafiken) und jeweilige Flüssigkeiten (rechte Grafiken).

Y-Achse: ausgezählte Zellen (count) (linke Grafiken) und FSC-A Median × (*) 10³ (rechte Grafiken).

Angabe der Werte aus unabhängigen Experimenten in Replikaten, Kennzeichnung mittels Sternchen (*) signifikanter Unterschiede durch Student's t-Test, Bonferroni-Korrektur.

Modifizierte Grafiken aus der Veröffentlichung: Seite 16, „Figure 5. Exposure of OAW-42 cells to D5W or PDS for 30 minutes at 42 °C leads to relevant cell shrinkage and is enhanced after 60 minutes.“, a und b (Löffler et al. 2019).

Bei der hyperthermen Behandlung für 30 Minuten sind in die Auswertung insgesamt rund 500 (MEM und D5W) bzw. über 350 (PDS) ausgezählte Zellen eingeflossen. Nach der halbstündigen HIPEC weist die Spitze des Histogramms ca. einen FSC-A = 105×10^3 für die Simulation in MEM auf. Daneben lässt sich eine signifikante Linksverschiebung zeigen: für die Zellgröße wird bei der Aufnahme in der D5W in etwa ein FSC-A = 82×10^3 gemessen, während diese in der PDS mit einem FSC-A = 79×10^3 geringfügig kleiner ausfällt.

Die Verlängerung des hyperthermen Verfahrens auf 60 Minuten führt zu einer verringerten Anzahl von ausgezählten OAW42 Zellen und liegt insgesamt in einem Bereich von 250-275. Es ergibt sich für das MEM keine Änderung des FSC-A im Vergleich zu der halbstündigen HIPEC, während sich die gemessene Zellgröße bei der verlängerten Simulation in der D5W (ca. FSC-A = 67×10^3) und in der PDS (ca. FSC-A = 73×10^3) weiter deutlich verkleinert.

3.6 Mikroskopie: Höhe der OAW42 Zellschicht

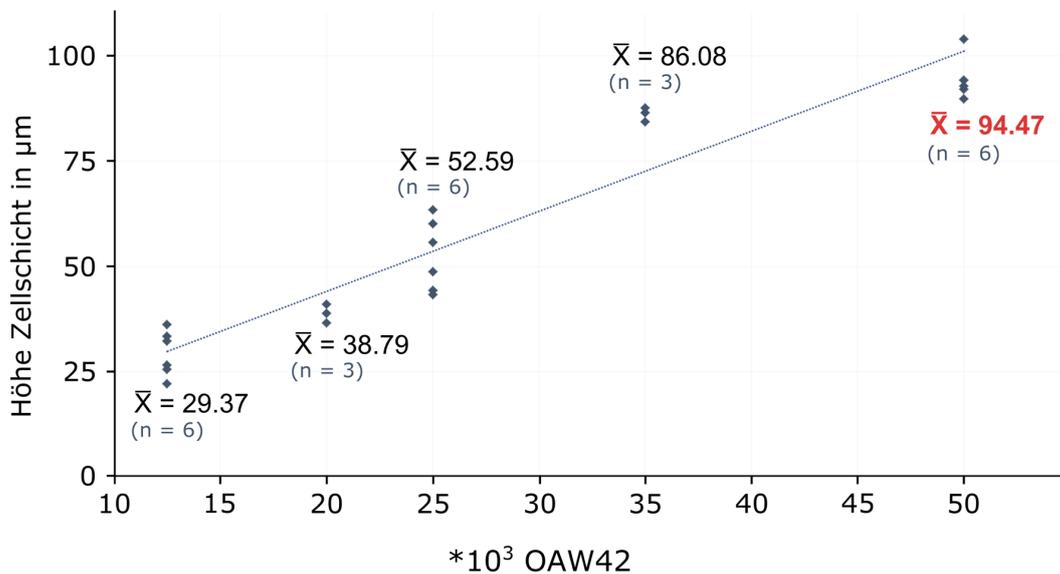


Abbildung 24: Mikroskopie: Höhe der OAW42 Zellschicht

Mikroskopisch bestimmtes Maß der OAW42 Zellschicht nach der 24-stündigen Kultivierung.

X-Achse: Modellsystem mit einer unterschiedlichen Anzahl von ausgesäten Zellen pro Well in der 96-Well-Platte: $12,5 \times 10^3$, $20,0 \times 10^3$, $25,0 \times 10^3$, $35,0 \times 10^3$ und $50,0 \times 10^3$.

Y-Achse: mikroskopisch gemessene Höhe der Zellschicht in μm .

Angabe der Mittelwerte (\bar{X}) aus bis zu 2 unabhängigen Experimenten in Replikaten ($n = 3$ bzw. $n = 6$). Eingefügte Trendlinie (blau gestrichelte Gerade), Mittelwert für $50,0 \times 10^3$ OAW42 Zellen durch eine rote Schriftfarbe hervorgehoben.

Modifizierte Grafik aus dem Supplement der Veröffentlichung: Seite 11, „Supp. Fig. 15 Assessment of the thickness of an OAW-42 cell layer seeded at different densities“ (Löffler et al. 2019).

Aus der grafischen Darstellung lässt sich ableiten, dass eine annähernd lineare Korrelation zwischen der Anzahl von ausgesäten OAW42 Zellen und der sich daraus resultierenden Höhe der Zellschicht im Modellsystem besteht. Für die in dieser Dissertation verwendeten $50,0 \times 10^3$ Zellen pro Well ergibt sich ein aufgerundetes Maß der Dicke von ca. $95 \mu\text{m}$ nach der 24-stündigen Kultivierung.

3.7 RTCA: Caco2 Zellen, HIPEC 30 Minuten und Langzeitversuche

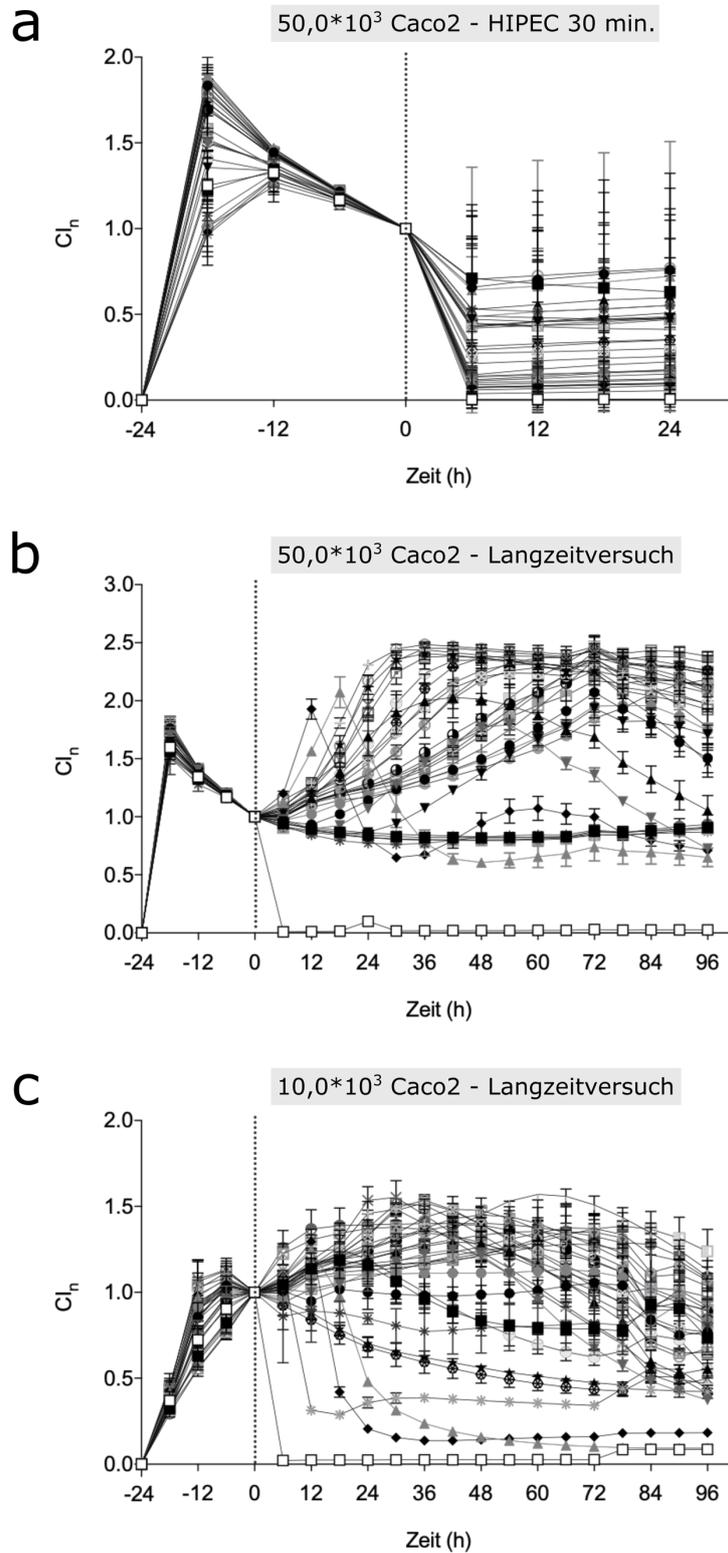


Abbildung 25: Caco2 Zellen, HIPEC 30 Minuten und Langzeitversuche

RTCA-Experimente. Modellsystem mit $50,0 \times 10^3$ (a und b) und $10,0 \times 10^3$ (c) Caco2 Zellen pro Well in der E-Plate 96. HIPEC Simulation: 30 Minuten, 42 °C und 50 rpm (a) und kontinuierliche Exposition mit hälftig MEM (b und c).

Ohne Legende: Positivkontrollen (Triton X-100), Negativkontrollen (PDS), MEM, IPM der Patienten 1, 3 und 7: pre, 5 min., 10 min., 15 min., 20 min., 25 min. und 30 min. sowie in vitro hergestellte OCS in der PDS in den Konzentrationen 5,6 µg/ml, 11,2 µg/ml, 22,5 µg/ml, 45,0 µg/ml, 90,0 µg/ml, 180,0 µg/ml und 230,0 µg/ml.

X-Achse: Zeit in Stunden (h), 6-stündiges Intervall, Gesamtlaufzeit 24 Stunden (a) bzw. 96 Stunden (b und c).

Y-Achse: Cl_n , gestrichelte Vertikale markiert Cl_n (0 h).

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung, Anzahl der Replikate: 2-4.

In den RTCA-Experimenten weist zunächst die eintägige Kultivierung einige Auffälligkeiten auf. Während die OAW42 Zellen nach einem initialen Anstieg der gemessenen Impedanz nach wenigen Stunden ein stabiles Ausgangsniveau erreichen, ist bei den Caco2 Zellen wiederum ein sukzessiver Rückgang zu verzeichnen. Wenngleich es in der Anfangsphase zu einer steilen Zunahme des detektierten Cl_n kommt, fällt dieser nach Erreichen einer Spitzenbildung progressiv ab. Lediglich bei der Verwendung von $10,0 \times 10^3$ Zellen pro Well scheint dieser Effekt nicht in dem Maße ausgeprägt zu sein. Im weiteren Verlauf sind nach Hinzugabe der Proben aufgrund der hohen Variabilität der Ergebnisse, eine Analyse und Auswertung, trotz einer Variation in der Zellzahl und der Länge der Expositionszeit, nicht möglich. Es konnten daher keine Rückschlüsse auf etwaige zytotoxische Effekte gezogen werden.

Insgesamt lässt sich somit für diese RTCA-Experimente festhalten, dass das etablierte Modellsystem für die Caco2 Zellen nicht zielführend ist.

4 Diskussion

4.1 Methoden

Die Grundlagen für die Modellierungen und Methodiken wurden von Löffler et al. etabliert, nachdem bislang überwiegend Tiermodelle für präklinische Forschungen eingesetzt wurden (Gremontez et al. 2016; Löffler et al. 2017). Im Allgemeinen muss bei den impedanzbasierten Experimenten der RTCA berücksichtigt werden, dass aufgrund der sich am Boden der E-Plate 96 befindlichen Goldelektroden ein erfassbares Ereignis vornehmlich auf den vollständigen Verlust bis zur untersten Zellschicht ausgerichtet ist. Demzufolge lassen sich Teileffekte nicht mit ausreichender Sicherheit verwerten. Nichtsdestotrotz ermöglicht die RTCA die Vitalität der malignen Zellen nach der zytotoxischen Intervention detailliert und kontinuierlich zu detektieren. Das verwendete Modellsystem bildet zudem die Leitidee der HIPEC als einen lokalen Therapieansatz ab, da die ca. 95 µm dicke OAW42 Zellschicht direkt mit den OCS exponiert ist. Somit werden die intraoperativen Gegebenheiten einer topischen Applikation mit hohen Konzentrationen des Pharmakons am Wirkungsort nahezu realistisch dargestellt.

Bei dem dynamischen Modellsystem besteht trotz Standardisierungen eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit der Versuche. Letztlich hätte eine mehrmalige Wiederholung der Experimente die interne Validität erhöht. Wesentliche Faktoren dieser interexperimentellen Heterogenität werden durch fehlerbehaftete Prozesse während der Labortätigkeit (bspw. keine homogene Vermischung der einzelnen Proben oder ein Zellverlust bei der Benutzung von Einwegsieben) hervorgerufen. In diesem Zusammenhang muss trotz einer akkuraten Arbeitsweise einschränkend bemerkt werden, dass es beim Befüllen der Wells mit den OCS teilweise zu Unterschieden in der Expositionsdauer von einigen Minuten kam. Entsprechend waren auftretende Verzögerungen unvermeidlich, die zu Auswirkungen auf die Einwirkzeit zwischen den verschiedenen Wells beigetragen und damit die Wirksamkeit des Zytostatikums beeinflusst haben könnten. Während diese Faktoren für die kontinuierlichen Langzeitversuche nahezu nicht von

Relevanz sind, könnte dies umso mehr für die kurzzeitige HIPEC Behandlung von Bedeutung sein.

Weiterhin lassen sich im Hinblick auf die Pharmakologie von Oxaliplatin in den Trägerlösungen Abgrenzungen zu den Bedingungen im Labor ziehen. In Anbetracht vermuteter, wechselseitiger Reaktionen steht im Vergleich zu der längerfristigen Aufbewahrung der vorbereiteten Proben im Labor die erst unmittelbar intraoperativ vorgenommene Durchmischung der Substanzen während der klinischen HIPEC.

In Bezug auf die Hyperthermie während der HIPEC Simulation ergeben sich ebenfalls Unterschiede bei der im Labor umgesetzten Behandlung, da hier erhebliche Temperaturschwankungen auftreten: Die Vorbereitungen unter der Sicherheitswerkbank wurden bei Raumtemperatur, das durchgeführte HIPEC Verfahren mit 42 °C sowie die nachfolgende Messung der RTCA bei Inkubation mit 37 °C vorgenommen. Im Gegensatz zu diesen Modellbedingungen findet während dem Operationsverfahren in vivo eine vorherige Erwärmung des Spülkreislaufs statt und erst bei Erreichen einer konstanten Temperatur erfolgt die Zugabe des Chemotherapeutikums. Der Transfer dieser Anwendung ist unter Laborbedingungen nicht praktikabel. Die E-Plate 96 mit den OCS benötigt eine gewisse Zeit für die Angleichung der beschriebenen Temperaturdifferenzen, da nur eine indirekte Wärmeübertragung vorliegt. Während vor dem Messbeginn der RTCA eine 10-minütige Pause eingelegt wurde, konnte dies für das HIPEC Verfahren im Inkubationsschüttler nicht umgesetzt werden. Womöglich kann diese Schwäche einer Wärmeadaptation bzw. mangelnden effektiven Hyperthermie durch Argumente der gering verwendeten Volumina sowie dem grundsätzlich fehlenden eindeutigen Nutzen der Temperaturerhöhung bei einer Simulation ex vivo entkräftet werden.

Eine andere Limitation der HIPEC unter Laborbedingungen liegt in der Variabilität der beiden operativen Verfahrenstechniken (Sugarbaker and Van der Speeten 2016). Die Modellierung kann am besten mit einer geschlossenen HIPEC verglichen werden, da die Behandlung der Zellen mit den OCS unter einer gedeckelten Platte in einer Folienverpackung simuliert wurde. Möglicherweise fallen dadurch insbesondere Wärmeeffekte an, welche die Konzentrationen von Oxaliplatin

(vorrangig 180,0 µg/ml bzw. 230,0 µg/ml) mit beeinflussen könnten. Es bleibt spekulativ, ob die Variante eines offenen Simulationsverfahrens unter Laborbedingungen zu einer veränderten Wirksamkeit der Behandlung geführt hätte, wie es für Tierversuche publiziert wurde (Facy et al. 2015; Ortega-Deballon et al. 2010).

Darüber hinaus ergaben sich technische Probleme bei der Entfernung des Inhalts aus den einzelnen Wells nach der HIPEC ex vivo, die trotz Optimierungsversuchen (u. a. die Arbeitstechnik des Pipettierens oder Zentrifugierens) nicht zu vermeiden waren. Explizit ist hierbei der ausgeprägte Zellverlust nach der hyperthermen Behandlung von 60 Minuten mit den OCS in der D5W zu nennen (s. 3.2.5), welcher eine adäquate Interpretation der erhaltenen Daten nicht ermöglichte. Dies stellt eine entscheidende Einschränkung für die Versuchsdurchführung dar.

Schließlich sind als bedeutende Einflussgröße die verwendeten Tumorzellen per se anzuführen. Es ist anzumerken, dass bei dem Zellverband aus der Kultivierung gegenüber dem Tumorgewebe eine verminderte inter- und extrazelluläre Matrix vorhanden ist. Dadurch lässt sich ein idealisiertes Modellsystem im Vergleich zu den Realbedingungen schaffen, das durch optimierte Bedingungen mit einer überschätzten Diffusion oder veränderten Druckverhältnissen verbunden sein könnte. Darüber hinaus verändern sich die allgemeinen Eigenschaften innerhalb einer stabilen Kultur mit fortlaufender Passagenummer (Briske-Anderson et al. 1997; Sambuy et al. 2005). Hierdurch kann eine Selektion von malignen Zellen mit der besten Adaption ans Überleben und mit Resistenzen stattfinden. Für die ovarielle Tumorzelllinie können sich deshalb nicht nur variable Empfindlichkeiten auf das Chemotherapeutikum ergeben, sondern auch geringe Abweichungen bez. der Zellschichtdicke. Entsprechende Varianzen innerhalb der insgesamt hohen Platinsensitivität der OAW42 Zellen sowie der notwendigen Eindringtiefe des Zytostatikums stehen mit direkten Folgen für die Wirksamkeit der HIPEC im Zusammenhang (Hills et al. 1989; Roberts et al. 2005). Andererseits werden auf diese Weise relativ wirklichkeitsnah die in vivo Gegebenheiten bei peritonealen Malignitäten wiedergegeben. Ferner führte die 24-stündige Kultivierung in den Experimenten beständig zu einem reproduzierbaren Korridor für

die gemessene Impedanz, weswegen einige angesprochenen Einflussfaktoren als potenziell nachrangig eingeschätzt werden können. Durch die anschließende Normierung des CI wurde zudem eine interexperimentelle Vergleichbarkeit hergestellt.

Die etablierte Modellierung ist mit der zusätzlichen Zelllinie Caco2 untersucht worden, um einen Bezug auf die aktuelle Studienlage der HIPEC auf Grundlage (von PM) des CRC herzustellen. Wie im Rahmen dieser Dissertation nachgewiesen wurde, scheint diese Zelllinie für das verwendete Modellsystem mit der RTCA nicht geeignet. Hierbei spielt insbesondere das nach der eintägigen Kultivierung erreichte Niveau der Impedanz eine wesentliche Rolle, zumal nur ausreichend hohe und reproduzierbare Werte eine klare Interpretation erlauben. Auch nach der HIPEC Simulation waren die Ergebnisse der durchgeführten Versuche nicht erschließbar. Die Problematik in der Methodik mit den Caco2 Zellen beruht wahrscheinlich auf der Art und Weise ihres Wachstumsverhaltens, wie sich entsprechend in mikroskopischen Aufnahmen herausstellte: Ab einer bestimmten Anzahl von Zellen ist eine flächige Konfluenz erreicht worden, die allerdings durch vereinzelte Haufenbildungen charakterisiert und demnach konträr zu der gleichmäßigen Schichtdicke der OAW42 Zellen ist. Untersuchungen an individuellen Patientenproben von verschiedenen peritoneal disseminierten Tumoren konnten ohnedies in vitro keinen Unterschied in der Sensitivität des zytotoxischen Wirkstoffprofils von Oxaliplatin zwischen dem Ovarialkarzinom und dem CRC mit PM aufzeigen (Mahteme et al. 2008).

4.2 Einordnung der Ergebnisse

Das IPM wurde bereits in publizierten Langzeitversuchen mittels RTCA charakterisiert (Löffler et al. 2017). Die erhaltenen zytotoxischen Eigenschaften konnten erneut in der Dissertation belegt werden. In der Folge stellten Untersuchungen unter realitätsnahen HIPEC Bedingungen das primäre Ziel dar. Aus den erhobenen Daten lässt sich festhalten, dass eine kurzzeitige Simulation der hyperthermen Behandlung bei 2/3 der untersuchten Patienten zu keiner messbaren Abnahme des CI_n unter 50 % innerhalb von 72 Stunden führte. Eine

Verlängerung der Expositionsdauer auf 60 Minuten ist mit einem deutlich stärkeren Verlust der Impedanz verbunden. Allerdings wurde dieses Kriterium nicht für alle Patienten erfüllt und es finden sich nennenswerte Unterschiede innerhalb des IPM und der verschiedenen Zeitpunkte der Proben. Dennoch wird die Replizierbarkeit einer zellschädigenden Wirksamkeit dadurch unterstrichen, dass diejenigen OCS, die bereits nach einer 30-minütigen HIPEC Simulation eine Zytotoxizität zeigen, diese auch nach Verlängerung der Behandlungsdauer auf eine Stunde aufweisen. Vor diesem Hintergrund der Zeitkinetik als einen wesentlichen Einflussfaktor lassen sich ebenfalls die Experimente mit einer kontinuierlichen Exposition auf den OAW42 Zellen ohne die für die HIPEC charakteristische Hyperthermie interpretieren. Für alle OCS konnte in diesen Langzeitversuchen das Unterschreiten der 50%igen Impedanz nachgewiesen werden. Neben der Verweildauer steht auf dieser Grundlage vornehmlich die Eindringtiefe von Oxaliplatin als ein maßgebliches Element zur Diskussion, zumal die laut Literatur angegebene Diffusionsstrecke des Platinderivats (1-2 mm ohne Angabe der Gewebeart und der hierfür benötigten Zeit) den ca. 95 µm exponierten Zellverband des Modellsystems um ein Vielfaches überschreitet (Sugarbaker and Van der Speeten 2016). Dies würde auch eine Erklärung für die Ergebnisse der RTCA-Experimente mit einer Wirkungsverstärkung nach einer längeren Kontaktzeit und niedrigeren Dosierungen von Oxaliplatin liefern. Ergänzend lassen die Untersuchungen von Forsythe et al. in diesem Zusammenhang darauf hindeuten, dass eine kurzzeitige Expositionszeit nicht durch die Verwendung von höheren Konzentrationen des Chemotherapeutikums ausgeglichen werden kann (Forsythe et al. 2020). Somit könnte die verbesserte Wirksamkeit der HIPEC durch eine längere (intraperitoneale) Verweildauer von Oxaliplatin potenziell erreicht werden, wie auch in Experimenten an CRC Zellen belegt werden konnte (Kirstein et al. 2008).

Abgesehen von der Penetration des Pharmakons lassen sich durch die Langzeitversuche der OCS auch Rückschlüsse auf die minimale effektive Dosierung treffen. Demnach reichen nur etwa 5-10 % der nach den gängigen Protokollen verwendeten Konzentrationen aus, um bei einer kontinuierlichen Exposition den Cl_n auf unter die Hälfte zu reduzieren. Die erhobenen RTCA-Experimente zeigen

dabei eine strenge Dosisabhängigkeit: Ein steigender Gehalt an Oxaliplatin ist mit einem schnelleren eintretenden Rückgang der Impedanz verbunden. Dies lässt darauf schließen, dass die Wirkstoffkonzentration ein weiterer entscheidender Einflussfaktor auf die Effektivität der HIPEC darstellt. Vorrangig sind in diesem Zusammenhang die intraoperativen Dosierungen in Anlehnung an das Protokoll der AVT (mittlere Konzentration 93,7 µg/ml) sowie an die PRODIGE 7 Studie (460 mg/m² für das offene Verfahren bzw. 360 mg/m² für die geschlossene HIPEC Technik in 2 l/m²) anzuführen (Löffler et al. 2017; Quenet et al. 2021). Folglich ergibt sich theoretisch ein deutlich höherer Gehalt des verwendeten Platinderivats in der PRODIGE 7 Studie im Vergleich zu dem des gemessenen IPM der AVT. Daran anknüpfend ist die Tatsache wichtig, dass für die OAW42 Zellen die Konzentration für die Empfindlichkeit gegenüber Oxaliplatin 0,05 µM beträgt und demnach dieser Wert nach den klinischen Protokollen um ein Vielfaches überschritten wird (Roberts et al. 2005). Dieser Umstand sollte bez. der Sensitivität der Tumorzelllinie für das eingesetzte Chemotherapeutikum beachtet werden. Im Übrigen wurde in anderen bereits veröffentlichten HIPEC Versuchen in vitro ein vergleichbarer Dosisbereich ausgewählt (Ubink et al. 2019). Durch die erhobenen AAS-Untersuchungen konnte generell eine Qualitätsprüfung der hergestellten Konzentrationen der OCS erreicht werden.

Letztere Versuche zeigen ferner, dass die HIPEC Dauer bei der Verwendung von der PDS prinzipiell keine Veränderungen auf den nachgewiesenen Gehalt an Oxaliplatin im Zellpellet zu bewirken scheint, obwohl die dargelegte Dosisabhängigkeit auf einen Konzentrationsgradienten hindeutet. Für die D5W stellt sich diese ebenfalls ein und die Verlängerung der hyperthermen Behandlung auf eine Stunde führt zu einer verstärkten Zunahme der Konzentrationen an Platin im Zelllysate bei den OCS ab 90,0 µg/ml. Spekulativ können folgende Gründe hierfür herangezogen werden: der gemeinsame Membrantransport von Oxaliplatin und Glukose ohne eine erkennbare Sättigungskinetik oder die intrazelluläre Bindung des Platinderivats in vermehrt durch D5W vorgeschädigten Zellen (s. RTCA-Experimente nach der 60-minütigen HIPEC). Die Aspekte der dosisabhängigen Penetration stimmen mit denen von Elias et al. ebenfalls mit der AAS erhobenen Erkenntnissen zur Pharmakokinetik der oxaliplatinhaltigen HIPEC

überein, da die gemessenen Konzentrationen des Pharmakons im Gewebe mit zunehmender Wirkstoffmenge anzusteigen scheint (Elias et al. 2002a).

Darüber hinaus zeichnet sich die HIPEC als eine lokale Chemotherapie unter hyperthermen Bedingungen aus, welche neben einer postulierten direkten Zytotoxizität und metabolischen Veränderungen auf zellulärer Basis unmittelbare Wirkungen auf die Pharmakologie von Oxaliplatin haben. Wie bereits in der Literatur dargelegt wird, könnten diese Temperatureffekte insbesondere bei einer verlängerten HIPEC Dauer auf eine Stunde zum Tragen kommen und die Wirksamkeit des Platinderivats zusätzlich verstärkt haben (Helderman et al. 2020; Piche et al. 2011; Rietbroek et al. 1997; Urano and Ling 2002). Hierin kann eine weitere Begründung für die erhöhte zytotoxische Wirkung der OCS nach der 60-minütigen hyperthermen Simulation in den RTCA-Versuchen liegen.

Dessen ungeachtet bleibt die Frage offen, warum sich für die in vitro hergestellte OCS mit der Konzentration 90,0 µg/ml in der PDS und in der D5W nach der 30-minütigen HIPEC Simulation keine zellschädigende Wirksamkeit nachweisen lässt, obgleich die Patientenproben mit einem annähernd identischen Gehalt des Platinderivats zum Teil ein konträres Verhalten aufzeigen. Dieser Aspekt sowie die Varianz der zytotoxischen Eigenschaften innerhalb des IPM kann bedingt dadurch erklärt werden, dass es sich um in vivo entnommenes Material handelt, das in direktem Kontakt mit dem Peritonealraum stand. Hinsichtlich der komplexen Behandlung der HIPEC mit ihren vielfältigen Komponenten finden sich dabei für jeden Patienten individuelle Faktoren vor. Hierzu gehört u. a. der pH-Wert. Etwa die übersäuerte Mikroumgebung der Malignität kann einen entscheidenden Einfluss auf eine Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika haben (De Milito and Fais 2005). Die Messung der pH-Werte des IPM konnte diesbezüglich relevante Schwankungen zwischen den Patienten widerlegen. Vielmehr scheint die Wahl der Trägerlösung selbst von Relevanz zu sein, da erhebliche Unterschiede zwischen den Proben nachgewiesen wurden. Das IPM sowie die in vitro hergestellten OCS in der PDS weisen tendenziell alkalische Werte auf. Beachtenswert ist, dass die chloridhaltige Lösung Abweichungen zwischen dem selbst erhobenen Wert (pH = 8,34) und dem der gebrauchsfertigen Herstellerangaben (pH = 7,40) offenbart. Oxaliplatin in den jeweiligen Dosierungen hatte darauf

keine nennenswerten Auswirkungen. Im Gegensatz hierzu ist für die D5W im Gesamtbild ein saures Milieu gemessen worden. Auffällig ist eine Korrelation zwischen einer zunehmenden Konzentration des Platinderivats und einem höheren pH-Wert, das auf Wechselwirkungen der beiden Substanzen hindeuten könnte. Einer zentralen Bedeutung kommt demnach der komplexen Pharmakologie von Oxaliplatin zu. Das Chemotherapeutikum reagiert sowohl im Blutkreislauf in kurzer Zeit mit verschiedenen Biomolekülen als auch in den unterschiedlichen zur Verdünnung verwendeten HIPEC Trägerlösungen (Graham et al. 2000; Jerremalm et al. 2004; Luo et al. 1999; Mehta et al. 2015; Pendyala and Creaven 1993). In der Literatur werden dabei mögliche Reaktionen mit der Bildung von (in)aktiven Intermediaten diskutiert (Jerremalm et al. 2004; Löffler et al. 2017; Mehta et al. 2015). Bei der Lösung des Pharmakons in chloridhaltige Flüssigkeiten wie der PDS werden vorherrschende Produkte aus Natriumbikarbonat und Platin gemutmaßt (Löffler et al. 2017). Für diese aktiven Metaboliten werden erhaltene oder gar erhöhte zytotoxische Eigenschaften angenommen (Löffler et al. 2017; Mehta et al. 2015). Ob sich in diesem Zusammenhang auch eine Erklärung für die beobachtete Kinetik der vermehrt zellschädigenden Effekte für das IPM kurz nach dem Hinzufügen von Oxaliplatin finden lässt, bleibt offen.

Gegenteilig verhält es sich für das Chemotherapeutikum in der D5W, für das in Untersuchungen eine gewisse Stabilität durch die Bildung von Assoziationskomplexen bei hohen Konzentrationen des Platinderivats aufgezeigt wurde und u. U. chemisch inerte Eigenschaften erklären könnte (Di Pasqua et al. 2011; Eiden et al. 2009). Diese Aspekte lassen sich durch die erhobenen RTCA-Experimente dahingehend stützen, dass für die OCS in der PDS nach einer halbstündigen HIPEC Behandlung eine zellschädigende Wirksamkeit eintrat, wohingegen für die D5W keine Zytotoxizität detektiert wurde. Es sollte allerdings die erhöhte Reliabilität der Messwerte v. a. für die Dosierung von 180,0 µg/ml in der D5W Beachtung finden. Nichtsdestoweniger bleiben die genauen inhaltlichen Bestandteile sowie das gegenseitige Verhalten in der zusammengesetzten Wirkstofflösung weitestgehend unbekannt. Speziell für das Platinderivat ist nicht näher eruiert, welcher Anteil sich in Komplexe umwandelt, obgleich bei der HIPEC sich nur rund 10-15 % der ursprünglichen Substanz nachweisen ließ

(Löffler et al. 2017). Als tragender Wirkmechanismus ist dabei der DACH-Ligand näher erforscht (Raymond et al. 1998; Rixe et al. 1996). Diese reaktive Gruppe von Oxaliplatin geht Bindungen (mitunter die Interaktion mit der DNA) ein und könnte das inerte und potenziell atoxische Platin-Molekül hinterlassen. Gleichwohl steht auch der Einfluss eines immunologisch vermittelten Zelltods noch zur Klärung aus (Stojanovska et al. 2019; Tesniere et al. 2010). Diese nicht ausgeschlossene Aktivierung einer Immunantwort wäre allerdings in dem verwendeten Modellsystem nicht abgebildet und könnte eine Ursache für die dargestellten Einschränkungen der oxaliplatinbasierten HIPEC sein.

Ungeachtet der von den Herstellern angegebenen (theoretischen) Osmolarität liegt ein Unterschied der beiden Trägerlösungen in ihrem Anteil an wasserfreier Glukose: Während für die D5W ein Gehalt von 50,0 g/l aufgeführt wird, beinhaltet die PDS neben zusätzlichen zahlreichen Elektrolyten im direkten Vergleich 22,7 g/l. Grundsätzlich erzeugt Glukose durch die Hypertonizität einen osmotischen Gradienten, welcher aufgrund der zellulären Homöostase einen Ausgleich durch Flüssigkeitsverschiebungen anstrebt. Dabei kommt es zu einem Efflux aus der Zelle, der wiederum zu einer Verringerung des Zellvolumens führt (Alfieri and Petronini 2007). Um die Eigenschaften der OAW42 Zellen während der HIPEC näher aufzuschließen, wurde die Zellgröße mittels der Durchflusszytometrie bestimmt. Wie anhand der Histogramme deutlich wird, reicht eine halbstündige Exposition bei 42 °C aus, eine signifikante Zellschrumpfung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen in MEM zu verursachen. Die Verminderung der Zellgröße wurde durch eine 60-minütige HIPEC Simulation weiter verstärkt. Das Ausmaß der intrazellulären Volumenreaktion lässt sich vermutlich auf den unterschiedlichen Gehalt an Glukose als treibende Kraft zurückführen. Dennoch ergab sich für die D5W mit einem höheren Anteil an wasserfreier Glukose als die PDS keine relevante Differenz in der Zellgröße nach der halbstündigen hyperthermen Behandlung. Möglicherweise ist die Verlängerung um zusätzliche 30 Minuten wesentlich, damit diese Effekte bei den verwendeten dextroshaltigen Flüssigkeiten verstärkt zum Tragen kommen. Eine Erklärung hierfür lässt sich potenziell daraus ableiten, dass eine schnelle Anpassung an die hyperosmolare Stresssituation über frühe Regulationsmechanismen mittels Ionentransporte über die

Zellmembran gewährleistet wird (Alfieri and Petronini 2007). Diese Kompensation der Zelladaptation könnte jedoch durch das Fehlen von Elektrolyten in der D5W im Gegensatz zu der PDS nicht erfolgen. Schließlich kann es durch die etwaigen Flüssigkeitsverschiebungen auch zu Beeinträchtigungen der gewünschten Diffusion von Oxaliplatin in die Zelle kommen. Obgleich dieser Aspekt noch unzureichend geklärt ist, wäre hierdurch eine Abschwächung der Wirkung folglich denkbar. Darüber hinaus liefern die Ergebnisse der Durchflusszytometrie möglicherweise auch einen Erklärungsansatz für die Einschränkungen der RTCA-Untersuchungen bei der 60-minütigen HIPEC Exposition mit Oxaliplatin in der D5W, bei welchen ein massiver Verlust der adhären OAW42 Zellen zu beobachten war.

In der Zusammenarbeit mit dem PIT wurden die erhobenen Daten der RTCA-Versuche durch 2 weitere, unabhängige Experimente (CTB und SRB) validiert. Grundsätzlich bestätigten diese Untersuchungen die zuvor erhaltenen Resultate: In beiden Trägerlösungen hat die 30-minütige HIPEC mit Oxaliplatin keinen Zelltod innerhalb von 3 Tagen zur Folge. Im Gegensatz dazu lässt sich bei einer dauerhaften Exposition auf den ovariellen Tumorzellen eine konstante Verringerung ihrer Lebensfähigkeit feststellen. Neben den OAW42 Zellen wurde zusätzlich die in das NCI-60 aufgenommene CRC-Zelllinie HT29 verwendet (Shoemaker 2006). Die Sensitivität gegenüber Oxaliplatin wird hierbei mit der Konzentration 72,44 $\mu\text{mol/l}$ angegeben, die zu einer 50%igen Verringerung der gemessenen Proteine führt (Kim et al. 2012). Dieser Wert steht in Kontrast zu dem der malignen ovariellen Zellen (0,05 μM) (Roberts et al. 2005). Die unterschiedliche Empfindlichkeit auf Platin spiegelt sich auch in den Ergebnissen wider, da die OAW42 Zellen im Vergleich zu den HT29 einen tendenziell stärkeren Verlust der Zellviabilität aufweisen. Die Unterschiede zwischen den Versuchsdurchführungen sind, dass in den RTCA-Experimenten die höchste Konzentration von Oxaliplatin (230,0 $\mu\text{g/ml}$) in der PDS zu einer Abnahme des $\text{Cl}_n < 0,5$ führte, wohingegen im CTB und SRB dies nicht erreicht wurde. Dies kann zum einen mit der Genauigkeit der einzelnen Assay zusammenhängen oder zum anderen durch die unterschiedliche Handhabung der Methodik erklärt werden. Dennoch sind die Daten mit den Ergebnissen der RTCA vergleichbar,

sodass den chloridhaltigen Lösungen nach der 30-minütigen HIPEC Simulation verhältnismäßig stärkere zytotoxische Eigenschaften zugeschrieben werden können.

4.3 Einordnung der Studienlage

Allgemein sind Modellsysteme sowie die unter Laborbedingungen erhobenen Resultate simplifizierend und können die Realität entsprechend nur bedingt abbilden. Daher sind diese bereits vorab gesondert diskutiert worden (s. 4.1 und 4.2). Gleichwohl ist die Einordnung in den Forschungskontext essenziell und unabdingbar. Im Rahmen dieser Dissertation war es möglich, eine Verknüpfung zu der aktuellen Studienlage hinsichtlich des ungeklärten Zugewinns einer oxaliplatinbasierten HIPEC herzustellen und wesentliche Erkenntnisse zu dieser wissenschaftlichen Fragestellung beizutragen.

Von grundlegendem Stellenwert für die Etablierung des multimodalen Behandlungskonzepts bei PM des CRC ist die prospektive und randomisierte Phase-III-Studie von Verwaal et al. aus dem Jahr 2003, welche für die CRS und HIPEC (90 Minuten mit Mitomycin C bei 40 °C) im Vergleich zu der alleinigen intravenösen Chemotherapie (Fluorouracil-Leucovorin) eine durchschnittlich doppelt so hohe Gesamtüberlebensrate belegen konnte (Verwaal et al. 2003; Verwaal et al. 2008). Trotz der hervorzuhebenden Bedeutung für das Therapieergebnis dieser selektiven Patienten sollte nicht unberücksichtigt bleiben, dass das Studiendesign keine getrennte Bewertung der beiden Methodiken CRS und HIPEC zuließ (Yurttas et al. 2020). Darüber hinaus sollte zudem kritisch angemerkt werden, dass eine breite Heterogenität der Malignitäten eingeschlossen und ein überholtes Protokoll der systemischen Chemotherapie für die Kontrollgruppe verwendet wurde (Yurttas et al. 2020).

Während sich das hypertherme Verfahren daher vorrangig als klinische Therapieoption beim fortgeschrittenen CRC integrieren konnte, steht nach dem gegenwärtigen Forschungsstand ihre grundsätzliche Bedeutung in Frage und international zur Diskussion aus. Unweigerlich werden die CRS und HIPEC seit ihrer Etablierung miteinander praktiziert, weshalb es an einer exakten

Trennschärfe beider Behandlungsmethoden mangelt. Ungeklärt bleibt demnach die Kernfrage, ob das hypertherme Verfahren (mit Oxaliplatin) im Allgemeinen einen Zugewinn oder eher eine untergeordnete, wenn nicht gar nachteilige, Einflussnahme mit sich bringt.

Von höchster Relevanz ist in diesem Zusammenhang die Publikation der französischen Phase-III-Studie PRODIGE 7, die keinen Vorteil im medianen Gesamtüberleben für Patienten mit PM des CRC nach einer 30-minütigen HIPEC mit Oxaliplatin im Vergleich zur alleinigen CRS nachweisen konnte (Quenet et al. 2021). In dieser randomisierten, multizentrischen Untersuchung wurde somit nicht nur der unabhängige Nutzen einer additiven HIPEC zur chirurgischen Vorgehensweise (beim CRC) widerlegt, sondern auch eine erhöhte Komplikationsrate (Grad III und höher) sowie längere Krankenhausaufenthalte in dieser Gruppe beobachtet (Quenet et al. 2021). Die Mortalität und Morbiditätsrate waren annähernd vergleichbar zu den Angaben in der anderweitigen Literatur (Glockzin et al. 2013).

Vor der eigentlichen Veröffentlichung wurden die vorläufigen Resultate der PRODIGE 7 Studie intensiv diskutiert und bereits vielfache technische und methodische Kritikpunkte vorgebracht (Ceelen 2019). Insbesondere das Studiendesign mit Schwächen bez. der statistischen Power ist bemängelt worden, da die Grundannahme eines mittleren Zugewinns des Gesamtüberlebens von 30 Monate auf 48 Monate allein durch die HIPEC und damit ihre generelle Bedeutsamkeit überschätzt wurde (Liberale et al. 2019). Zudem merken die Autoren der PRODIGE 7 Studie im Diskussionsteil ihrer Publikation die Auswahl des primären Endpunkts, das Vorhandensein von Cross-over zwischen den beiden Gruppen, die fehlende Möglichkeit einer Auswertung des RAS- bzw. BRAF-Mutationsstatus sowie die eingeschränkte Angabe der Tumorlokalisation an (Quenet et al. 2021). Ungeachtet dessen wird neben dem langjährigen Rekrutierungsprozess der Einschluss von Patienten mit einem hohen PCI bis 25 zurückhaltend betrachtet, da für das Ausmaß der peritonealen Beteiligung vom CRC bereits ein PCI über 15-17 mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Elias et al. 2014; Goere et al. 2015). Allerdings ist für die PRODIGE 7 Studie der mediane PCI mit 9 bzw. 10 angegeben, der wiederum für das Übertreffen der

erwarteten Prognose durch das Therapieschema mitverantwortlich sein kann (Quenet et al. 2021). Darüber hinaus wird jedoch eine Ursache für den nicht vorteilhaften Ausgang der HIPEC Gruppe in der prozentual schlechter erreichten CCR begründet liegen, welche nachweislich mit einem verminderten Gesamtüberleben korreliert (Hallam et al. 2019). Weiterführend kann die (neo)adjuvante bzw. perioperative Chemotherapie angezweifelt werden. Im pharmakologischen Kontext zeigt eine intravenöse Monotherapie mit Oxaliplatin beim CRC nur begrenzte Ansprechraten (Becouarn et al. 1998). Da ein kombiniertes Chemotherapieschema intraabdominal kaum praktikabel ist, werden die gängigen HIPEC Protokolle mit einer begleitenden Systemtherapie ergänzt (in der Regel 5-Fluorouracil-Leucovorin). Dieses bidirektionale Verfahren kann beim fortgeschrittenen CRC trotz einer nachgewiesenen Verbesserung der Ansprechraten und dadurch der Therapieergebnisse unter der Annahme einer peritonealen Plasmabarriere grundsätzlich angezweifelt werden (Andre et al. 2004; de Gramont et al. 2000; Giacchetti et al. 2000; Jacquet and Sugarbaker 1996b; Kemeny et al. 2004; Rothenberg et al. 2003). Ergänzend führen die Autoren der PRODIGE 7 Studie zu der systemischen (und ggf. zielgerichteten) Therapie an, dass es neben den positiven Einflüssen auf die klinischen Resultate zu einer Patientenselektion von Langzeitüberlebenden gekommen sein könnte (Quenet et al. 2021). Daran anknüpfend wurde eventuell durch eine neoadjuvante Chemotherapie das Hervorrufen von Resistenzen gegenüber Oxaliplatin gefördert, wie sich bspw. auch in ex vivo Analysen an CRC Proben nachweisen ließ (Nagourney et al. 2021; Quenet et al. 2021).

Dementgegen kann der PRODIGE 7 Studie offensichtlich auch ein Nutzen der Therapie aus CRS und HIPEC entnommen werden. Scheinbar könnte die Untergruppe mit einem PCI von 11-15 von der halbstündigen HIPEC mit Oxaliplatin profitieren, wie sich nicht nur in einer Post-hoc-Analyse dieser Publikation herausgestellt hat (Leung et al. 2017; Quenet et al. 2021). In diesem Kontext einer hoch selektierten Patientengruppe, bei der eine Überlegenheit der HIPEC zur alleinigen CRS nahegelegt werden konnte, lässt sich die randomisiert kontrollierte Studie unter van Driel et al. anführen (van Driel et al. 2018). Es sollte allerdings im Vergleich zu der PRODIGE 7 Studie das abweichende HIPEC Protokoll

(90 Minuten mit Cisplatin bei 40 °C) sowie das platinsensitive Ovarialkarzinom als Tumorentität (entsprechend der im Modellsystem verwendeten OAW42 Zellen) beachtet werden. Im Übrigen lassen sich ebenfalls für diese Studie zahlreiche Kritikpunkte anführen und es wird sich allgemein in gynäkologischen Fachkreisen tiefer mit der Rolle der HIPEC auseinandergesetzt (Alter et al. 2020; Vergote et al. 2019).

Ungeachtet dessen sollte für die PRODIGE 7 Studie betont werden, dass in beiden Versuchsgruppen nach 5 Jahren ein mittleres Gesamtüberleben von über 41 Monaten und rezidivfreie Überlebensraten von 13,1-14,8 % erreicht wurden (Quenet et al. 2021). Dies steht in Übereinstimmung mit bislang veröffentlichten Studien, die bei PM des CRC mit scheinbar hochwirksamen Protokollen und maximalen Therapiemöglichkeiten (CRS, HIPEC und systemische Chemotherapie) ein medianes bzw. rezidivfreies Überleben von bis zu 62,7 Monaten bzw. 16 % vorbringen (Elias et al. 2009; Goere et al. 2013). Der hervorzuhebende Benefit dieses multimodalen Behandlungskonzepts mit 1-Jahres-Gesamtüberlebensraten von 86,9-88,3 % in der PRODIGE 7 Studie steht bspw. im starken Kontrast zu neuartig zugelassenen Krebsmedikamenten, welche lediglich mit einem medianen Überlebensvorteil von wenigen Monaten verbunden sind (Ladanie et al. 2020; Quenet et al. 2021).

Nichtsdestotrotz liegt die Vermutung nahe, dass das Langzeitüberleben maßgeblich durch die vollständige CRS per se bestimmt ist. Weitergehend könnten dadurch womöglich potenzielle Nachteile der HIPEC maskiert werden. Es kann angenommen werden, dass unter der Berücksichtigung einer adäquaten Patientenselektion und dem Ausmaß der malignen Entartung die chirurgische Vorgehensweise an sich die hochwirksame, gar kurative Therapieoption für PM gastrointestinaler und gynäkologischer Tumorerkrankungen darstellt. Wenngleich hierfür Standardisierungen und eine nachgewiesene Lernkurve belegt sind, sollte angesichts der operativen Komplexität und der unabdingbaren Notwendigkeit einer möglichst maximalen CRS die Behandlung vornehmlich an erfahrenen Zentren erfolgen (Kuijpers et al. 2016; Kusamura et al. 2013; van de Vlasakker et al. 2021). Es könnte genau dieser chirurgischen Expertise in spezialisierten Kliniken geschuldet sein, dass die effektvollen Resultate der CRS in der

PRODIGE 7 Studie verzerrt wiedergegeben wird und sich dadurch das wirksame Potenzial der oxaliplatinhaltigen HIPEC nicht deutlich offenlegen konnte (Quenet et al. 2021). Die relativ hohe Morbidität dieses Hochrisikoeingriffs sowie die relevanten Limitationen bei einer unvollständigen chirurgischen Resektion (ab CCR-1), bei weit fortgeschrittenen bzw. invasiven Erkrankungen und bei instabilen Patienten dürfen dabei nicht unberücksichtigt bleiben (Hallam et al. 2019; Macri et al. 2020; Piso et al. 2009; Piso et al. 2019).

Die PRODIGE 7 Studie stellt eine entscheidende Weiche für die Rolle der oxaliplatinbasierten HIPEC bzw. der vielfachen Protokolle und hat weitreichende Konsequenzen. Der wesentliche Einfluss dieser wissenschaftlichen Untersuchung fortan auf die klinische Anwendung wurde durch eine weltweite Expertenbefragung deutlich (van de Vlasakker et al. 2021). Der Konsens plädierte dabei hinsichtlich der HIPEC nicht nur für einen Wechsel des intra-peritoneal verabreichten Chemotherapeutikums und für eine Verlängerung der Perfusionszeit, sondern gar für das Entfernen aus den entsprechenden Leitlinien (van de Vlasakker et al. 2021). Ob allerdings die Evidenz der PRODIGE 7 Studie ausreicht, ein solch gängiges HIPEC Protokoll in der klinischen Praxis als ungültig zu erklären, bleibt dahingestellt.

Ergänzend unterstützen die im Rahmen dieser Dissertation vorgestellten Resultate einer insuffizienten Effektivität der kurzzeitigen HIPEC mit hochdosiertem Oxaliplatin nicht nur die klinischen Ergebnisse der PRODIGE 7 Studie, sondern es lassen sich in dieser Hinsicht auch Berührungspunkte zu anderen Untersuchungen an Organoiden sowie an Zelllinien im Tiermodell bei Patienten mit PM des CRC finden (Liesenfeld et al. 2020; Ubink et al. 2019). Damit kann die eigentliche Leitidee der HIPEC Methodik, nach der CRS mikroskopisch verbliebene Tumorzellen suffizient zu eliminieren, prinzipiell hinterfragt werden.

Vor dem Hintergrund der vielfach beobachteten und prognostisch ungünstigen Rezidivsituation sind Einschränkungen der hyperthermen Behandlung mit Oxaliplatin ebenfalls in der adjuvanten und prophylaktischen Therapie von ausschlaggebender Bedeutung (Tan et al. 2018; van Oudheusden et al. 2015b). Im adjuvanten Setting zeigt die Forschungsarbeit der COLOPEC Studie einen ausbleibenden Nutzen des hyperthermen Verfahrens mit dem Platinderivat bei lokal

fortgeschrittenem CRC im Hinblick auf das PM freie Überleben im Vergleich zu einer systemischen Chemotherapie allein (Klaver et al. 2019). Diese Erkenntnisse lassen sich weiter auf die randomisierte Studie PROPHYLOCHIP-PRODIGE 15 übertragen, da routinemäßige Nachsorgeuntersuchungen für Patienten mit einem hohen Risiko für die Entwicklung von PM des CRC ausreichend sind und der Beitrag einer Second-Look-Operation mit oxaliplatinbasierter HIPEC das krankheitsfreie Überleben nicht verbessern kann (Goere et al. 2020). Somit wird das hypertherme Verfahren mit dem Platinderivat als standardmäßige Option zur lokalen Tumorkontrolle in Frage gestellt.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die in der experimentellen Dissertation dargelegte abgeschwächte bzw. fehlende Wirksamkeit einer kurzzeitigen HIPEC mit Oxaliplatin im Kontext der aktuellen Studienlage gesehen werden kann und sich für dieses Verfahren Übereinstimmungen hinsichtlich einer unzureichenden Behandlungstherapie bei malignen Erkrankungen des Peritoneums finden lassen.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In der Schlussfolgerung konnten die erhobenen Ergebnisse zusätzliche, stützende Hinweise für die klinisch in Studien festgestellte Ineffektivität der kurzzeitigen HIPEC mit Oxaliplatin liefern. Es lassen sich hauptsächlich folgende kritische Ansatzpunkte und Variablen für die beeinträchtigte Wirkung (im Modellsystem) zusammenfassen: die relative Effektivdosis des Pharmakons, die Expositionszeit unter hyperthermen Bedingungen (30 Minuten gegenüber längeren Verfahren) sowie die Wahl der Trägerlösungen (PDS oder D5W) aufgrund potenzieller Interaktionen.

Demnach liegt eine Schwäche der CRS und HIPEC grundsätzlich in ihrer multimodalen Methodik, die klinisch eine gemeinsame Anwendung findet. Die chirurgische Intervention nimmt dabei eine Schlüsselposition ein und stellt eine entscheidende Ausgangsposition für neuartige Behandlungskonzepte dar. Speziell für die HIPEC werden wiederum komplexe Teilaspekte miteinander kombiniert, wie etwa die intraperitoneale Chemotherapie, die Hyperthermie oder

das perioperative Management mit einer additiven systemischen Therapie. Für den Ausblick liegt somit der primäre Forschungsansatz darin, die einzelnen Komponenten des heterogenen Verfahrens spezifisch und getrennt voneinander zu beleuchten.

Infolgedessen können hinsichtlich der Wahl der zytotoxischen Substanz andere geeignete Chemotherapeutika bzw. rationale Kombinationen tendenziell für die Anwendung in Betracht gezogen werden. Für die am häufigsten verabreichten Substanzen ist einerseits Mitomycin C zu nennen, für das eine vergleichbare Studienlage vorliegt (Zhang et al. 2020). Andererseits lässt sich Cisplatin anführen, welches sich als fester Bestandteil der HIPEC Protokolle in der Gynäkologie als Vorteil bringend herausgestellt hat (van Driel et al. 2018).

Von besonderem pharmakologischen Interesse sind zudem innovative und neuartige Ansätze bez. einer verbesserten lokalen Verabreichung der intraperitonealen Wirkstoffe: Erwähnenswerte Beispiele sind in diesem Zusammenhang der Einsatz von Mikropartikeln bzw. der Nanomedizin sowie eine Anwendung auf Basis von Hydrogelen oder Albumin (Dakwar et al. 2017; Lu et al. 2008; Van de Sande et al. 2020; Van Oudheusden et al. 2015a). Weiterhin kann auch die Tumormikroumgebung ein vielversprechendes therapeutisches Ziel darstellen (Ceelen et al. 2020). So ist im Tiermodell gezeigt worden, dass eine Vorbehandlung mit VEGF-Inhibitoren die intraperitoneale Penetration von Oxaliplatin verbessern und das Wachstum von PM verzögern kann (Gremontprez et al. 2015). Da zudem immunologische Einflussfaktoren zur Diskussion ausstehen, wäre in dieser Hinsicht die gezielte Immunmodulation ein schlüssiger Forschungsaspekt, wie bspw. bei PM des Adenokarzinoms vom Magen geschlossen wurde (Wang et al. 2020). Im weiteren Zusammenhang ist die individuelle Tumorbiologie (für eine zielgerichtete Krebstherapie) künftig zunehmend von Relevanz. Es konnten u. a. Analysen von Patienten mit PM des CRC eine ausgeprägte Anreicherung des Subtyps CMS4 zeigen, welcher nachweislich mit einer schlechteren Prognose bei der Therapie mit Fluorouracil-Leucovorin plus Oxaliplatin verbunden ist (Song et al. 2016; Ubink et al. 2018). Zweifelsohne sollte vornherein geklärt sein, welche Patientengruppe per se mit welcher Tumorentität und Histologie von der (oxaliplatinbasierten) HIPEC profitiert.

Ebenfalls stellt eine wesentliche Grundlage das dynamische Modellsystem dar. Dabei stehen die Etablierung und Entwicklung neuartiger Methodiken im Vordergrund (Steuperaert et al. 2017). Um einen Bezug auf diese Dissertation zu nehmen, wären hier die Ansatzpunkte ein offenes Verfahren der HIPEC zu simulieren, die Ergebnisse an einer anderen Zelllinie (v. a. CRC) zu bestätigen oder einen Zellverlust bei den OCS in der D5W bei der 60-minütigen hyperthermen Behandlung zu umgehen. In diesem Kontext können auch aus Untersuchungen an Organoiden von Malignitäten des Patienten zielführende Erkenntnisse für (personalisierte) Therapieoptionen gewonnen werden (Narasimhan et al. 2020). Ferner sollte grundsätzlich eine Überlegenheit erhöhter Temperaturen während der HIPEC gegenüber einer Normothermie nachgewiesen werden. Man darf allerdings nicht vergessen, vordergründig die klinische Praktikabilität (bspw. eine angemessene zeitliche Beschränkung angesichts der insgesamt langen Operationsdauer) zu berücksichtigen.

Aufgrund dieser verschiedenen Aspekte muss betont werden, dass die Rolle der HIPEC im Gegensatz zu der chirurgischen Vorgehensweise ein experimentelles Behandlungsverfahren für PM (des CRC) ist und die Klinik angesichts der dargelegten Limitationen vor eine entscheidende Herausforderung stellt. Demzufolge ist für die kritische Einordnung ihrer Bedeutung eine intensiviertere (pharmakologische) und präklinische Grundlagenforschung notwendig. Durch randomisierte kontrollierte Studiendesigns lassen sich evidenzbasierte Standardisierungen für einen bevorzugten, optimalen Therapieansatz etablieren, damit gezielt fundierte Protokolle in internationale Richtlinien aufgenommen werden können.

5 Zusammenfassung

Das zweiblättrige Peritoneum überzieht als seröse Auskleidung die Abdominalhöhle bzw. Teile des Beckens und übernimmt vielfältige physiologische Funktionen. Grundsätzlich kann von dieser einlagigen Gewebeschicht aus Mesothelzellen selbst eine Malignität ausgehen, weitaus häufiger ist die Ursache des Tumorbefalls allerdings auf eine peritoneale Metastasierung von gastrointestinalen und gynäkologischen Primärkarzinomen zurückzuführen. Für diese Erkrankung gab es einst nur limitierte Behandlungsmöglichkeiten und war daher einem terminalen Stadium mit geringer Lebensqualität gleichzusetzen. Mit der Einführung eines multimodalen Therapiekonzepts, bestehend aus der CRS und HIPEC, konnte bei selektierten Patienten im Vergleich zu der bisherigen palliativen Chemotherapie eine signifikante Lebensverlängerung erzielt werden.

Speziell für das HIPEC Verfahren existieren gegenwärtig keine international standardisierten Protokolle und der additive Nutzen dieser hyperthermen Behandlung wird im Gegensatz zu der CRS nach der aktuellen Studienlage weitestgehend hinterfragt. Insbesondere die Wahl des Zytostatikums Oxaliplatin im Zusammenhang mit einer intraoperativen HIPEC Dauer von 30 Minuten, wie sie vorzugsweise als klinisches Verfahren für PM des CRC eingesetzt wird, steht spätestens seit der randomisierten Phase-III-Studie PRODIGE 7 zur Diskussion aus.

Die Dissertation hat sich ex vivo mit dem IPM von 9 eingeschlossenen Patienten der AVT sowie in vitro mit hergestellten OCS in klinisch relevanten Konzentrationen in den beiden Trägerlösungen der PDS und der D5W unter realitätsnahen HIPEC Bedingungen (42 °C) befasst. Die Experimente wurden in einem publizierten Modellsystem auf Grundlage der ovariellen Karzinomzelllinie OAW42 durchgeführt, die als wesentlichen Faktor eine gemessene Schichtdicke von ca. 95 µm bilden. Die Etablierung von Versuchen, die auf der CRC-Zelllinie Caco2 basieren, erwiesen sich als nicht praktikabel. Zur Beurteilung der Untersuchungen ist die bewährte RTCA zum Einsatz gekommen.

Die Experimente konnten für alle verwendeten OCS eine Zytotoxizität nachweisen, wenn diese kontinuierlich auf den Zellen exponiert wurden. Eine kurzzeitige

HIPEC Simulation von 30 Minuten hingegen zeigte sowohl für die Patientenproben als auch für die OCS in den entsprechend definierten Dosierungen nach den gegenwärtigen Behandlungsprotokollen (der AVT und PRODIGE 7 Studie) nur eine abgeschwächte bzw. fehlende Wirksamkeit. Durch die Verlängerung des hyperthermen Verfahrens auf eine Stunde ließ sich eine Verstärkung der oxaliplatinhaltigen Zellschädigung darlegen. In diesem Zusammenhang konnte die extern erfolgte Analytik der AAS eine Konzentrationsabhängigkeit sowie Qualitätssicherung der OCS verdeutlichen. Ferner sind Teile der Resultate durch das PIT mit weiteren Versuchen (CTB und SRB) und an der zusätzlichen CRC Zelllinie HT29 validiert worden.

Als Erklärungsansatz kann eine unzureichende Penetrationstiefe und Verteilung des Platinderivats in den Zellverband bei einer zu kurzen hyperthermen Expositionszeit vermutet werden. Neben den verwendeten Dosierungen scheinen darüber hinaus noch größtenteils unbekannte pharmakologische Effekte durch potenzielle Interaktionen von Oxaliplatin mit der PDS und mit der D5W (u. a. die Bildung von Intermediaten) und spezifische Faktoren wie der pH-Wert eine nicht unwesentliche Einflussnahme zu haben. Eine bedeutende Erkenntnis stellt zudem die in der Durchflusszytometrie nachgewiesene Reduktion der Zellgröße der mit Hyperthermie behandelten OAW42 Zellen in den beiden Trägerlösungen dar, die womöglich auf relevante Flüssigkeitsverschiebungen durch einen osmotischen Gradienten zurückzuführen ist.

Abschließend muss der Nutzen und die zytotoxische Effektivität einer kurzzeitigen HIPEC Behandlung mit Oxaliplatin basierend auf den hier aufgezeigten Ergebnissen sowie der klinischen Studienlage prinzipiell hinterfragt werden. Generell wird die unabdingbare Notwendigkeit der pharmakologischen und präklinischen Grundlagenforschung sowie die Durchführung von intensivierten Untersuchungen in diesem komplexen und multifaktoriellen Therapiekonzept deutlich. Für die HIPEC als eine experimentelle Behandlungsmethode ist es unentbehrlich, perspektivisch die Wahl und die Dosierung eines geeigneten Zytostatikums sowie dessen intraperitoneale Applikation (die Solution und die Expositionsdauer) näher zu eruieren und international zu standardisieren.

6 Literaturverzeichnis

- ACEA BIOSCIENCES INC. 2013. *The xCELLigence System* [Online]. Available: https://www.ols-bio.de/wp-content/uploads/2020/07/brochure_sp-mp_lores-ols.pdf [Accessed 20.07.2021].
- AGILENT TECHNOLOGIES INC. 2021. *Cellular Impedance Explained* [Online]. Available: <https://www.agilent.com/en/technology/cellular-impedance> [Accessed 20.07.2021].
- ALFIERI, R. R. & PETRONINI, P. G. 2007. Hyperosmotic stress response: comparison with other cellular stresses. *Pflugers Arch*, 454, 173-85.
- ALLAIN, P., HEUDI, O., CAILLEUX, A., LE BOUIL, A., LARRA, F., BOISDRONCELLE, M. & GAMELIN, E. 2000. Early biotransformations of oxaliplatin after its intravenous administration to cancer patients. *Drug Metab Dispos*, 28, 1379-84.
- ALTER, R., TURAGA, K. & LENGYEL, E. 2020. Are We Ready for Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in the Upfront Treatment of Ovarian Cancer? *JAMA Netw Open*, 3, e2014184.
- ANDRE, T., BONI, C., MOUNEDJI-BOUDIAF, L., NAVARRO, M., TABERNERO, J., HICKISH, T., TOPHAM, C., ZANINELLI, M., CLINGAN, P., BRIDGEWATER, J., TABAH-FISCH, I., DE GRAMONT, A. & MULTICENTER INTERNATIONAL STUDY OF OXALIPLATIN/5-FLUOROURACIL/LEUCOVORIN IN THE ADJUVANT TREATMENT OF COLON CANCER, I. 2004. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*, 350, 2343-51.
- ARJONA-SANCHEZ, A., AZIZ, O., PASSOT, G., SALTI, G., ESQUIVEL, J., VAN DER SPEETEN, K., PISO, P., NEDELICUT, D. S., SOMMARIVA, A., YONEMURA, Y., TURAGA, K., SELVASEKAR, C. R., RODRIGUEZ-ORTIZ, L., SANCHEZ-HIDALGO, J. M., CASADO-ADAM, A., RUFIAN-PENA, S., BRICENO, J. & GLEHEN, O. 2021. Laparoscopic cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for limited peritoneal metastasis. The PSOGI international collaborative registry. *Eur J Surg Oncol*, 47, 1420-1426.
- BAKRIN, N., BEREDER, J. M., DECULLIER, E., CLASSE, J. M., MSIKA, S., LORIMIER, G., ABOUD, K., MEEUS, P., FERRON, G., QUENET, F., MARCHAL, F., GOUY, S., MORICE, P., POMEL, C., POCARD, M., GUYON, F., PORCHERON, J., GLEHEN, O. & GROUP, F. 2013. Peritoneal carcinomatosis treated with cytoreductive surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) for advanced ovarian carcinoma: a French multicentre retrospective cohort study of 566 patients. *Eur J Surg Oncol*, 39, 1435-43.
- BARLOGIE, B., CORRY, P. M. & DREWINKO, B. 1980. In vitro thermochemotherapy of human colon cancer cells with cis-dichlorodiammineplatinum(II) and mitomycin C. *Cancer Res*, 40, 1165-8.
- BECOARN, Y., YCHOU, M., DUCREUX, M., BOREL, C., BERTHEAULT-CVITKOVIC, F., SEITZ, J. F., NASCA, S., NGUYEN, T. D., PAILLOT, B., RAOUL, J. L., DUFFOUR, J., FANDI, A., DUPONT-ANDRE, G. & ROUGIER, P. 1998. Phase II trial of oxaliplatin as first-line chemotherapy

- in metastatic colorectal cancer patients. Digestive Group of French Federation of Cancer Centers. *J Clin Oncol*, 16, 2739-44.
- BEKHOR, E., CARR, J., HOFSTEDT, M., SULLIVAN, B., SOLOMON, D., LEIGH, N., BOLTON, N., GOLAS, B., SARPEL, U., LABOW, D. & MAGGE, D. 2020. The Safety of Iterative Cytoreductive Surgery and HIPEC for Peritoneal Carcinomatosis: A High Volume Center Prospectively Maintained Database Analysis. *Ann Surg Oncol*, 27, 1448-1455.
- BONNOT, P. E., PIESSEN, G., KEPENEKIAN, V., DECULLIER, E., POCARD, M., MEUNIER, B., BEREDER, J. M., ABOUD, K., MARCHAL, F., QUENET, F., GOERE, D., MSIKA, S., ARVIEUX, C., PIRRO, N., WERNERT, R., RAT, P., GAGNIERE, J., LEFEVRE, J. H., COURVOISIER, T., KIANMANESH, R., VAUDOYER, D., RIVOIRE, M., MEEUS, P., PASSOT, G., GLEHEN, O., FREGAT & NETWORKS, B.-R. 2019. Cytoreductive Surgery With or Without Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy for Gastric Cancer With Peritoneal Metastases (CYTOCHIP study): A Propensity Score Analysis. *J Clin Oncol*, 37, 2028-2040.
- BRIND'AMOUR, A., WEBB, M., PARAPINI, M., SIDERIS, L., SEGEDI, M., CHUNG, S. W., CHARTIER-PLANTE, S., DUBE, P., SCUDAMORE, C. H. & KIM, P. T. W. 2021. The role of intraperitoneal chemotherapy in the surgical management of pancreatic ductal adenocarcinoma: a systematic review. *Clin Exp Metastasis*, 38, 187-196.
- BRISKE-ANDERSON, M. J., FINLEY, J. W. & NEWMAN, S. M. 1997. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 214, 248-57.
- BROUWERS, E. E., HUITEMA, A. D., BEIJNEN, J. H. & SCHELLENS, J. H. 2008. Long-term platinum retention after treatment with cisplatin and oxaliplatin. *BMC Clin Pharmacol*, 8, 7.
- CARMIGNANI, C. P., SUGARBAKER, T. A., BROMLEY, C. M. & SUGARBAKER, P. H. 2003. Intraperitoneal cancer dissemination: mechanisms of the patterns of spread. *Cancer Metastasis Rev*, 22, 465-72.
- CASHIN, P. H., MAHTEME, H., GRAF, W., KARLSSON, H., LARSSON, R. & NYGREN, P. 2013. Activity ex vivo of cytotoxic drugs in patient samples of peritoneal carcinomatosis with special focus on colorectal cancer. *BMC Cancer*, 13, 435.
- CEELEN, W., DE SOMER, F., VAN NIEUWENHOVE, Y., VANDE PUTTE, D. & PATTYN, P. 2013. Effect of perfusion temperature on glucose and electrolyte transport during hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion (HIPEC) with oxaliplatin. *Eur J Surg Oncol*, 39, 754-9.
- CEELEN, W. 2019. HIPEC with oxaliplatin for colorectal peritoneal metastasis: The end of the road? *Eur J Surg Oncol*, 45, 400-402.
- CEELEN, W., RAMSAY, R. G., NARASIMHAN, V., HERIOT, A. G. & DE WEVER, O. 2020. Targeting the Tumor Microenvironment in Colorectal Peritoneal Metastases. *Trends Cancer*, 6, 236-246.
- CEELEN, W. P. & BRACKE, M. E. 2009. Peritoneal minimal residual disease in colorectal cancer: mechanisms, prevention, and treatment. *Lancet Oncol*, 10, 72-9.

- CHALRET DU RIEU, Q., WHITE-KONING, M., PICAUD, L., LOCHON, I., MARSILI, S., GLADIEFF, L., CHATELUT, E. & FERRON, G. 2014. Population pharmacokinetics of peritoneal, plasma ultrafiltrated and protein-bound oxaliplatin concentrations in patients with disseminated peritoneal cancer after intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion of oxaliplatin following cytoreductive surgery: correlation between oxaliplatin exposure and thrombocytopenia. *Cancer Chemother Pharmacol*, 74, 571-82.
- CHARRIER, T., PASSOT, G., PERON, J., MAURICE, C., GOCEVSKA, S., QUENET, F., EVENO, C., POCARD, M., GOERE, D., ELIAS, D., ORTEGA-DEBALLON, P., VAUDOYER, D., COTTE, E. & GLEHEN, O. 2016. Cytoreductive Surgery Combined with Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy with Oxaliplatin Increases the Risk of Postoperative Hemorrhagic Complications: Analysis of Predictive Factors. *Ann Surg Oncol*, 23, 2315-22.
- CHIVA, L. M. & GONZALEZ-MARTIN, A. 2015. A critical appraisal of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in the treatment of advanced and recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 136, 130-5.
- CHU, D. Z., LANG, N. P., THOMPSON, C., OSTEEEN, P. K. & WESTBROOK, K. C. 1989. Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors. *Cancer*, 63, 364-7.
- CHUA, T. C., ROBERTSON, G., LIAUW, W., FARRELL, R., YAN, T. D. & MORRIS, D. L. 2009. Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery in ovarian cancer peritoneal carcinomatosis: systematic review of current results. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135, 1637-45.
- CHUA, T. C., MORAN, B. J., SUGARBAKER, P. H., LEVINE, E. A., GLEHEN, O., GILLY, F. N., BARATTI, D., DERACO, M., ELIAS, D., SARDI, A., LIAUW, W., YAN, T. D., BARRIOS, P., GOMEZ PORTILLA, A., DE HINGH, I. H., CEELLEN, W. P., PELZ, J. O., PISO, P., GONZALEZ-MORENO, S., VAN DER SPEETEN, K. & MORRIS, D. L. 2012. Early- and long-term outcome data of patients with pseudomyxoma peritonei from appendiceal origin treated by a strategy of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *J Clin Oncol*, 30, 2449-56.
- COCCOLINI, F., CATENA, F., GLEHEN, O., YONEMURA, Y., SUGARBAKER, P. H., PISO, P., MONTORI, G. & ANSALONI, L. 2015. Complete versus incomplete cytoreduction in peritoneal carcinosis from gastric cancer, with consideration to PCI cut-off. Systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*, 41, 911-9.
- CURIS, E., PROVOST, K., BOUVET, D., NICOLIS, I., CRAUSTE-MANCIET, S., BROSSARD, D. & BENAETH, S. 2001. Carboplatin and oxaliplatin decomposition in chloride medium, monitored by XAS. *J Synchrotron Radiat*, 8, 716-8.
- DAKWAR, G. R., SHARIATI, M., WILLAERT, W., CEELLEN, W., DE SMEDT, S. C. & REMAUT, K. 2017. Nanomedicine-based intraperitoneal therapy for the treatment of peritoneal carcinomatosis - Mission possible? *Adv Drug Deliv Rev*, 108, 13-24.

- DE GRAMONT, A., FIGER, A., SEYMOUR, M., HOMERIN, M., HMISSI, A., CASSIDY, J., BONI, C., CORTES-FUNES, H., CERVANTES, A., FREYER, G., PAPAMICHAEL, D., LE BAIL, N., LOUVET, C., HENDLER, D., DE BRAUD, F., WILSON, C., MORVAN, F. & BONETTI, A. 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 18, 2938-47.
- DE LIMA VAZQUEZ, V., STUART, O. A., MOHAMED, F. & SUGARBAKER, P. H. 2003. Extent of parietal peritonectomy does not change intraperitoneal chemotherapy pharmacokinetics. *Cancer Chemother Pharmacol*, 52, 108-12.
- DE MILITO, A. & FAIS, S. 2005. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol*, 1, 779-86.
- DE SOMER, F., CEELLEN, W., DELANGHE, J., DE SMET, D., VANACKERE, M., PATTYN, P. & MORTIER, E. 2008. Severe hyponatremia, hyperglycemia, and hyperlactatemia are associated with intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion with oxaliplatin. *Perit Dial Int*, 28, 61-6.
- DESIDERIO, J., CHAO, J., MELSTROM, L., WARNER, S., TOZZI, F., FONG, Y., PARISI, A. & WOO, Y. 2017. The 30-year experience-A meta-analysis of randomised and high-quality non-randomised studies of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the treatment of gastric cancer. *Eur J Cancer*, 79, 1-14.
- DESOLNEUX, G., MAZIERE, C., VARA, J., BROUSTE, V., FONCK, M., BECHADE, D., BECOUARN, Y. & EVRARD, S. 2015. Cytoreductive surgery of colorectal peritoneal metastases: outcomes after complete cytoreductive surgery and systemic chemotherapy only. *PLoS One*, 10, e0122816.
- DI PASQUA, A. J., KERWOOD, D. J., SHI, Y., GOODISMAN, J. & DABROWIAK, J. C. 2011. Stability of carboplatin and oxaliplatin in their infusion solutions is due to self-association. *Dalton Trans*, 40, 4821-5.
- DICKSON, J. A. & CALDERWOOD, S. K. 1980. Temperature range and selective sensitivity of tumors to hyperthermia: a critical review. *Ann N Y Acad Sci*, 335, 180-205.
- DREXLER, H. G. & UPHOFF, C. C. 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39, 75-90.
- EHRSSON, H., WALLIN, I. & YACHNIN, J. 2002. Pharmacokinetics of oxaliplatin in humans. *Med Oncol*, 19, 261-5.
- EIDEN, C., PHILIBERT, L., BEKHTARI, K., POUJOL, S., MALOSSE, F. & PINGUET, F. 2009. Physicochemical stability of oxaliplatin in 5% dextrose injection stored in polyvinyl chloride, polyethylene, and polypropylene infusion bags. *Am J Health Syst Pharm*, 66, 1929-33.
- EL-KAREH, A. W. & SECOMB, T. W. 2004. A theoretical model for intraperitoneal delivery of cisplatin and the effect of hyperthermia on drug penetration distance. *Neoplasia*, 6, 117-27.
- ELFERINK, F., VAN DER VIJGH, W. J., KLEIN, I., TEN BOKKEL HUIJINK, W. W., DUBBELMAN, R. & MCVIE, J. G. 1988. Pharmacokinetics of carboplatin after intraperitoneal administration. *Cancer Chemother Pharmacol*, 21, 57-60.

- ELIAS, D., BONNAY, M., PUIZILLOU, J. M., ANTOUN, S., DEMIRDJIAN, S., EL, O. A., PIGNON, J. P., DROUARD-TROALEN, L., OUELLET, J. F. & DUCREUX, M. 2002a. Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis: pharmacokinetics and tissue distribution. *Ann Oncol*, 13, 267-72.
- ELIAS, D., EL OTMANY, A., BONNAY, M., PACI, A., DUCREUX, M., ANTOUN, S., LASSER, P., LAURENT, S. & BOURGET, P. 2002b. Human pharmacokinetic study of heated intraperitoneal oxaliplatin in increasingly hypotonic solutions after complete resection of peritoneal carcinomatosis. *Oncology*, 63, 346-52.
- ELIAS, D., MATSUHISA, T., SIDERIS, L., LIBERALE, G., DROUARD-TROALEN, L., RAYNARD, B., POCARD, M., PUIZILLOU, J. M., BILLARD, V., BOURGET, P. & DUCREUX, M. 2004. Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin plus irinotecan after complete resection of peritoneal carcinomatosis: pharmacokinetics, tissue distribution and tolerance. *Ann Oncol*, 15, 1558-65.
- ELIAS, D., LEFEVRE, J. H., CHEVALIER, J., BROUQUET, A., MARCHAL, F., CLASSE, J. M., FERRON, G., GUILLOIT, J. M., MEEUS, P., GOERE, D. & BONASTRE, J. 2009. Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *J Clin Oncol*, 27, 681-5.
- ELIAS, D., MARIANI, A., CLOUTIER, A. S., BLOT, F., GOERE, D., DUMONT, F., HONORE, C., BILLARD, V., DARTIGUES, P. & DUCREUX, M. 2014. Modified selection criteria for complete cytoreductive surgery plus HIPEC based on peritoneal cancer index and small bowel involvement for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. *Eur J Surg Oncol*, 40, 1467-73.
- ESQUIVEL, J., STICCA, R., SUGARBAKER, P., LEVINE, E., YAN, T. D., ALEXANDER, R., BARATTI, D., BARTLETT, D., BARONE, R., BARRIOS, P., BIELIGK, S., BRETCHA-BOIX, P., CHANG, C. K., CHU, F., CHU, Q., DANIEL, S., DE BREE, E., DERACO, M., DOMINGUEZ-PARRA, L., ELIAS, D., FLYNN, R., FOSTER, J., GAROFALO, A., GILLY, F. N., GLEHEN, O., GOMEZ-PORTILLA, A., GONZALEZ-BAYON, L., GONZALEZ-MORENO, S., GOODMAN, M., GUSHCHIN, V., HANNA, N., HARTMANN, J., HARRISON, L., HOEFER, R., KANE, J., KECMANOVIC, D., KELLEY, S., KUHN, J., LAMONT, J., LANGE, J., LI, B., LOGGIE, B., MAHTEME, H., MANN, G., MARTIN, R., MISIH, R. A., MORAN, B., MORRIS, D., ONATE-OCANA, L., PETRELLI, N., PHILIPPE, G., PINGPANK, J., PITROFF, A., PISO, P., QUINONES, M., RILEY, L., RUTSTEIN, L., SAHA, S., ALRAWI, S., SARDI, A., SCHNEEBAUM, S., SHEN, P., SHIBATA, D., SPELLMAN, J., STOJADINOVIC, A., STEWART, J., TORRES-MELERO, J., TUTTLE, T., VERWAAL, V., VILLAR, J., WILKINSON, N., YOUNAN, R., ZEH, H., ZOETMULDER, F., SEBBAG, G. & SOCIETY OF SURGICAL ONCOLOGY ANNUAL, M. 2007. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of peritoneal surface malignancies of colonic origin: a consensus statement. Society of Surgical Oncology. *Ann Surg Oncol*, 14, 128-33.

- ESQUIVEL, J. 2009. Technology of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the United States, Europe, China, Japan, and Korea. *Cancer J*, 15, 249-54.
- EVENO, C. & POCARD, M. 2016. Randomized controlled trials evaluating cytoreductive surgery (CRS) and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in prevention and therapy of peritoneal metastasis: a systematic review. *Pleura Peritoneum*, 1, 169-182.
- FACY, O., AL SAMMAN, S., MAGNIN, G., GHIRINGHELLI, F., LADOIRE, S., CHAUFFERT, B., RAT, P. & ORTEGA-DEBALLON, P. 2012. High pressure enhances the effect of hyperthermia in intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin: an experimental study. *Ann Surg*, 256, 1084-8.
- FACY, O., COMBIER, C., POUSSIER, M., MAGNIN, G., LADOIRE, S., GHIRINGHELLI, F., CHAUFFERT, B., RAT, P. & ORTEGA-DEBALLON, P. 2015. High pressure does not counterbalance the advantages of open techniques over closed techniques during heated intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin. *Surgery*, 157, 72-8.
- FAIVRE, S., CHAN, D., SALINAS, R., WOYNAROWSKA, B. & WOYNAROWSKI, J. M. 2003. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 66, 225-37.
- FEFERMAN, Y., SOLOMON, D., BHAGWANDIN, S., KIM, J., AYCART, S. N., FEINGOLD, D., SARPEL, U. & LABOW, D. M. 2019. Sites of Recurrence After Complete Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy for Patients with Peritoneal Carcinomatosis from Colorectal and Appendiceal Adenocarcinoma: A Tertiary Center Experience. *Ann Surg Oncol*, 26, 482-489.
- FERRON, G., DATTEZ, S., GLADIEFF, L., DELORD, J. P., PIERRE, S., LAFONT, T., LOCHON, I. & CHATELUT, E. 2008. Pharmacokinetics of heated intraperitoneal oxaliplatin. *Cancer Chemother Pharmacol*, 62, 679-83.
- FISCHEL, J. L., FORMENTO, P., CICCOLINI, J., ROSTAGNO, P., ETIENNE, M. C., CATALIN, J. & MILANO, G. 2002. Impact of the oxaliplatin-5 fluorouracil-folinic acid combination on respective intracellular determinants of drug activity. *Br J Cancer*, 86, 1162-8.
- FISCHER, A. H., JACOBSON, K. A., ROSE, J. & ZELLER, R. 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*, 2008, pdb prot4986.
- FLANAGAN, M., SOLON, J., CHANG, K. H., DEADY, S., MORAN, B., CAHILL, R., SHIELDS, C. & MULSOW, J. 2018. Peritoneal metastases from extra-abdominal cancer - A population-based study. *Eur J Surg Oncol*, 44, 1811-1817.
- FLESSNER, M. F. 2005. The transport barrier in intraperitoneal therapy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288, F433-42.
- FLESSNER, M. F. 2008. Endothelial glycocalyx and the peritoneal barrier. *Perit Dial Int*, 28, 6-12.
- FLOOD, M., NARASIMHAN, V., WATERS, P., RAMSAY, R., MICHAEL, M., WARRIER, S. & HERIOT, A. 2020. Survival after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for colorectal peritoneal

- metastases: A systematic review and discussion of latest controversies. *Surgeon*.
- FOGH, J., WRIGHT, W. C. & LOVELESS, J. D. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*, 58, 209-14.
- FORSYTHE, S. D., SASIKUMAR, S., MOAVEN, O., SIVAKUMAR, H., SHEN, P., LEVINE, E. A., SOKER, S., SKARDAL, A. & VOTANOPOULOS, K. I. 2020. Personalized Identification of Optimal HIPEC Perfusion Protocol in Patient-Derived Tumor Organoid Platform. *Ann Surg Oncol*, 27, 4950-4960.
- FOSTER, J. M., SLEIGHTHOLM, R., PATEL, A., SHOSTROM, V., HALL, B., NEILSEN, B., BARTLETT, D. & SMITH, L. 2019. Morbidity and Mortality Rates Following Cytoreductive Surgery Combined With Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy Compared With Other High-Risk Surgical Oncology Procedures. *JAMA Netw Open*, 2, e186847.
- GAGNIERE, J., VEZIAN, J., PEREIRA, B., PEZET, D., LE ROY, B. & SLIM, K. 2018. Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy for the Elderly: Is It Reasonable? A Meta-Analysis. *Ann Surg Oncol*, 25, 709-719.
- GAMELIN, E., BOUIL, A. L., BOISDRON-CELLE, M., TURCANT, A., DELVA, R., CAILLEUX, A., KRIKORIAN, A., BRIENZA, S., CVITKOVIC, E., ROBERT, J., LARRA, F. & ALLAIN, P. 1997. Cumulative pharmacokinetic study of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 3, 891-9.
- GAMELIN, L., BOISDRON-CELLE, M., DELVA, R., GUERIN-MEYER, V., IFRAH, N., MOREL, A. & GAMELIN, E. 2004. Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: a retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-Fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 10, 4055-61.
- GERVAIS, M. K., DUBE, P., MCCONNELL, Y., DROLET, P., MITCHELL, A. & SIDERIS, L. 2013. Cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer. *J Surg Oncol*, 108, 438-43.
- GIACCHETTI, S., PERPOINT, B., ZIDANI, R., LE BAIL, N., FAGGIUOLO, R., FOCAN, C., CHOLLET, P., LLORY, J. F., LETOURNEAU, Y., COUDERT, B., BERTHEAUT-CVITKOVIC, F., LARREGAIN-FOURNIER, D., LE ROL, A., WALTER, S., ADAM, R., MISSET, J. L. & LEVI, F. 2000. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 18, 136-47.
- GILLY, F. N., CARRY, P. Y., SAYAG, A. C., BRACHET, A., PANTEIX, G., SALLE, B., BIENVENU, J., BURGARD, G., GUIBERT, B., BANSSILLON, V. & ET AL. 1994. Regional chemotherapy (with mitomycin C) and intraoperative hyperthermia for digestive cancers with peritoneal carcinomatosis. *Hepatogastroenterology*, 41, 124-9.

- GILLY, F. N., COTTE, E., BRIGAND, C., MONNEUSE, O., BEAUJARD, A. C., FREYER, G. & GLEHEN, O. 2006. Quantitative prognostic indices in peritoneal carcinomatosis. *Eur J Surg Oncol*, 32, 597-601.
- GLEHEN, O. & GILLY, F. N. 2003. Quantitative prognostic indicators of peritoneal surface malignancy: carcinomatosis, sarcomatosis, and peritoneal mesothelioma. *Surg Oncol Clin N Am*, 12, 649-71.
- GLEHEN, O., GILLY, F. N., ARVIEUX, C., COTTE, E., BOUTITIE, F., MANSVELT, B., BEREDER, J. M., LORIMIER, G., QUENET, F., ELIAS, D. & ASSOCIATION FRANCAISE DE, C. 2010a. Peritoneal carcinomatosis from gastric cancer: a multi-institutional study of 159 patients treated by cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg Oncol*, 17, 2370-7.
- GLEHEN, O., GILLY, F. N., BOUTITIE, F., BEREDER, J. M., QUENET, F., SIDERIS, L., MANSVELT, B., LORIMIER, G., MSAKA, S., ELIAS, D. & FRENCH SURGICAL, A. 2010b. Toward curative treatment of peritoneal carcinomatosis from nonovarian origin by cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy: a multi-institutional study of 1,290 patients. *Cancer*, 116, 5608-18.
- GLOCKZIN, G., VON BREITENBUCH, P., SCHLITT, H. J. & PISO, P. 2013. Treatment-related morbidity and toxicity of CRS and oxaliplatin-based HIPEC compared to a mitomycin and doxorubicin-based HIPEC protocol in patients with peritoneal carcinomatosis: a matched-pair analysis. *J Surg Oncol*, 107, 574-8.
- GLOCKZIN, G., GERKEN, M., LANG, S. A., KLINKHAMMER-SCHALKE, M., PISO, P. & SCHLITT, H. J. 2014. Oxaliplatin-based versus irinotecan-based hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in patients with peritoneal metastasis from appendiceal and colorectal cancer: a retrospective analysis. *BMC Cancer*, 14, 807.
- GOERE, D., MALKA, D., TZANIS, D., GAVA, V., BOIGE, V., EVENO, C., MAGGIORI, L., DUMONT, F., DUCREUX, M. & ELIAS, D. 2013. Is there a possibility of a cure in patients with colorectal peritoneal carcinomatosis amenable to complete cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy? *Ann Surg*, 257, 1065-71.
- GOERE, D., SOUADKA, A., FARON, M., CLOUTIER, A. S., VIANA, B., HONORE, C., DUMONT, F. & ELIAS, D. 2015. Extent of colorectal peritoneal carcinomatosis: attempt to define a threshold above which HIPEC does not offer survival benefit: a comparative study. *Ann Surg Oncol*, 22, 2958-64.
- GOERE, D., GLEHEN, O., QUENET, F., GUILLOIT, J. M., BEREDER, J. M., LORIMIER, G., THIBAudeau, E., GHOUTI, L., PINTO, A., TUECH, J. J., KIANMANESH, R., CARRETIER, M., MARCHAL, F., ARVIEUX, C., BRIGAND, C., MEEUS, P., RAT, P., DURAND-FONTANIER, S., MARIANI, P., LAKKIS, Z., LOI, V., PIRRO, N., SABBAGH, C., TEXIER, M., ELIAS, D. & GROUP, B.-R. 2020. Second-look surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus surveillance in patients at high risk of developing colorectal peritoneal metastases (PROPHYLOCHIP-PRODIGE 15): a randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 21, 1147-1154.

- GONZALEZ-MORENO, S. 2006. Peritoneal Surface Oncology: A progress report. *Eur J Surg Oncol*, 32, 593-6.
- GRAHAM, M. A., LOCKWOOD, G. F., GREENSLADE, D., BRIENZA, S., BAYSSAS, M. & GAMELIN, E. 2000. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res*, 6, 1205-18.
- GREMONPREZ, F., DESCAMPS, B., IZMER, A., VANHOVE, C., VANHAECKE, F., DE WEVER, O. & CEELLEN, W. 2015. Pretreatment with VEGF(R)-inhibitors reduces interstitial fluid pressure, increases intraperitoneal chemotherapy drug penetration, and impedes tumor growth in a mouse colorectal carcinomatosis model. *Oncotarget*, 6, 29889-900.
- GREMONPREZ, F., WILLAERT, W. & CEELLEN, W. 2016. Animal models of colorectal peritoneal metastasis. *Pleura Peritoneum*, 1, 23-43.
- HALLAM, S., TYLER, R., PRICE, M., BEGGS, A. & YOUSSEF, H. 2019. Meta-analysis of prognostic factors for patients with colorectal peritoneal metastasis undergoing cytoreductive surgery and heated intraperitoneal chemotherapy. *BJS Open*, 3, 585-594.
- HANBIDGE, A. E., LYNCH, D. & WILSON, S. R. 2003. US of the peritoneum. *Radiographics*, 23, 663-84; discussion 684-5.
- HASOVITS, C. & CLARKE, S. 2012. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intraperitoneal cancer chemotherapeutics. *Clin Pharmacokinet*, 51, 203-24.
- HELDERMAN, R., LOKE, D. R., KOK, H. P., OEI, A. L., TANIS, P. J., FRANKEN, N. & CREZEE, J. 2019. Variation in Clinical Application of Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy: A Review. *Cancers (Basel)*, 11.
- HELDERMAN, R., LOKE, D. R., VERHOEFF, J., RODERMOND, H. M., VAN BOCHOVE, G. G. W., BOON, M., VAN KESTEREN, S., GARCIA VALLEJO, J. J., KOK, H. P., TANIS, P. J., FRANKEN, N. A. P., CREZEE, J. & OEI, A. L. 2020. The Temperature-Dependent Effectiveness of Platinum-Based Drugs Mitomycin-C and 5-FU during Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) in Colorectal Cancer Cell Lines. *Cells*, 9.
- HELDIN, C. H., RUBIN, K., PIETRAS, K. & OSTMAN, A. 2004. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4, 806-13.
- HILL, S. M., RODGERS, C. S., HULTEN, M. A. & WILSON, A. P. 1984. Cytogenetics of a cell line derived from an ovarian papillary serous cystadenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 12, 321-7.
- HILLS, C. A., KELLAND, L. R., ABEL, G., SIRACKY, J., WILSON, A. P. & HARRAP, K. R. 1989. Biological properties of ten human ovarian carcinoma cell lines: calibration in vitro against four platinum complexes. *Br J Cancer*, 59, 527-34.
- HOMPES, D., D'HOORE, A., VAN CUTSEM, E., FIEUWS, S., CEELLEN, W., PEETERS, M., VAN DER SPEETEN, K., BERTRAND, C., LEGENDRE, H. & KERGER, J. 2012. The treatment of peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer with complete cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal peroperative chemotherapy (HIPEC) with oxaliplatin: a Belgian multicentre prospective phase II clinical study. *Ann Surg Oncol*, 19, 2186-94.

- HORVATH, P., YURTTAS, C., BECKERT, S., KONIGSRAINER, A. & KONIGSRAINER, I. 2021. Twelve-Year Single Center Experience Shows Safe Implementation of Developed Peritoneal Surface Malignancy Treatment Protocols for Gastrointestinal and Gynecological Primary Tumors. *Cancers (Basel)*, 13.
- HOWELL, S. B., PFEIFLE, C. L., WUNG, W. E., OLSHEN, R. A., LUCAS, W. E., YON, J. L. & GREEN, M. 1982. Intraperitoneal cisplatin with systemic thiosulfate protection. *Ann Intern Med*, 97, 845-51.
- HUANG, C. Q., MIN, Y., WANG, S. Y., YANG, X. J., LIU, Y., XIONG, B., YONEMURA, Y. & LI, Y. 2017. Cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy improves survival for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of current evidence. *Oncotarget*, 8, 55657-55683.
- IFTHIKAR, A. M., RATHOD, P. S., SHRUTHI, S., PALLAVI, V. R., SHOBHA, K., SHANKARANAND, B., UMADEVI, K. & BAFNA, U. D. 2014. Primary peritoneal carcinoma: regional cancer institute experience. *Indian J Surg Oncol*, 5, 232-6.
- IKOMA, N., BLUM, M., CHIANG, Y. J., ESTRELLA, J. S., ROY-CHOWDHURI, S., FOURNIER, K., MANSFIELD, P., AJANI, J. A. & BADGWELL, B. D. 2016. Yield of Staging Laparoscopy and Lavage Cytology for Radiologically Occult Peritoneal Carcinomatosis of Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*, 23, 4332-4337.
- ISAZA-RESTREPO, A., MARTIN-SAAVEDRA, J. S., VELEZ-LEAL, J. L., VARGAS-BARATO, F. & RIVEROS-DUENAS, R. 2018. The Peritoneum: Beyond the Tissue - A Review. *Front Physiol*, 9, 738.
- IVERSEN, L. H., RASMUSSEN, P. C. & LAURBERG, S. 2013. Value of laparoscopy before cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis. *Br J Surg*, 100, 285-92.
- JACQUET, P., JELINEK, J. S., STEVES, M. A. & SUGARBAKER, P. H. 1993. Evaluation of computed tomography in patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer*, 72, 1631-6.
- JACQUET, P. & SUGARBAKER, P. H. 1996a. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res*, 82, 359-74.
- JACQUET, P. & SUGARBAKER, P. H. 1996b. Peritoneal-plasma barrier. *Cancer Treat Res*, 82, 53-63.
- JERREMALM, E., HEDELAND, M., WALLIN, I., BONDESSON, U. & EHRSSON, H. 2004. Oxaliplatin degradation in the presence of chloride: identification and cytotoxicity of the monochloro monooxalato complex. *Pharm Res*, 21, 891-4.
- KEMENY, N., GARAY, C. A., GURTLER, J., HOCHSTER, H., KENNEDY, P., BENSON, A., BRANDT, D. S., POLIKOFF, J., WERTHEIM, M., SHUMAKER, G., HALLMAN, D., BURGER, B. & GUPTA, S. 2004. Randomized multicenter phase II trial of bolus plus infusional fluorouracil/leucovorin compared with fluorouracil/leucovorin plus oxaliplatin as third-line treatment of patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 22, 4753-61.

- KIDANI, Y., INAGAKI, K. & TSUKAGOSHI, S. 1976. Examination of antitumor activities of platinum complexes of 1,2-diaminocyclohexane isomers and their related complexes. *Gan*, 67, 921-2.
- KIDANI, Y., NOJI, M. & TASHIRO, T. 1980. Antitumor activity of platinum(II) complexes of 1,2-diamino-cyclohexane isomers. *Gan*, 71, 637-43.
- KIM, J., BHAGWANDIN, S. & LABOW, D. M. 2017. Malignant peritoneal mesothelioma: a review. *Ann Transl Med*, 5, 236.
- KIM, M. K., OSADA, T., BARRY, W. T., YANG, X. Y., FREEDMAN, J. A., TSAMIS, K. A., DATTO, M., CLARY, B. M., CLAY, T., MORSE, M. A., FEBBO, P. G., LYERLY, H. K. & HSU, D. S. 2012. Characterization of an oxaliplatin sensitivity predictor in a preclinical murine model of colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*, 11, 1500-1509.
- KIRSTEIN, M. N., ROOT, S. A., MOORE, M. M., WIEMAN, K. M., WILLIAMS, B. W., JACOBSON, P. A., MARKER, P. H. & TUTTLE, T. M. 2008. Exposure-response relationships for oxaliplatin-treated colon cancer cells. *Anticancer Drugs*, 19, 37-44.
- KLAVER, C. E. L., WISSELINK, D. D., PUNT, C. J. A., SNAEBJORNSSON, P., CREZEE, J., AALBERS, A. G. J., BRANDT, A., BREMERS, A. J. A., BURGER, J. W. A., FABRY, H. F. J., FERENSCHILD, F., FESTEN, S., VAN GREVENSTEIN, W. M. U., HEMMER, P. H. J., DE HINGH, I., KOK, N. F. M., MUSTERS, G. D., SCHOONDERWOERD, L., TUYNMAN, J. B., VAN DE VEN, A. W. H., VAN WESTREENEN, H. L., WIEZER, M. J., ZIMMERMAN, D. D. E., VAN ZWEEDEN, A. A., DIJKGRAAF, M. G. W., TANIS, P. J. & GROUP, C. C. 2019. Adjuvant hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with locally advanced colon cancer (COLOPEC): a multicentre, open-label, randomised trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 4, 761-770.
- KLAVER, Y. L., LEMMENS, V. E., CREEMERS, G. J., RUTTEN, H. J., NIENHUIJS, S. W. & DE HINGH, I. H. 2011. Population-based survival of patients with peritoneal carcinomatosis from colorectal origin in the era of increasing use of palliative chemotherapy. *Ann Oncol*, 22, 2250-6.
- KOH, J. L., YAN, T. D., GLENN, D. & MORRIS, D. L. 2009. Evaluation of preoperative computed tomography in estimating peritoneal cancer index in colorectal peritoneal carcinomatosis. *Ann Surg Oncol*, 16, 327-33.
- KONIGSRAINER, I., HORVATH, P., STRULLER, F., FORKL, V., KONIGSRAINER, A. & BECKERT, S. 2013. Risk factors for recurrence following complete cytoreductive surgery and HIPEC in colorectal cancer-derived peritoneal surface malignancies. *Langenbecks Arch Surg*, 398, 745-9.
- KUIJPERS, A. M., AALBERS, A. G., NIENHUIJS, S. W., DE HINGH, I. H., WIEZER, M. J., VAN RAMSHORST, B., VAN GINKEL, R. J., HAVENGA, K., HEEMSBERGEN, W. D., HAUPTMANN, M. & VERWAAL, V. J. 2015. Implementation of a standardized HIPEC protocol improves outcome for peritoneal malignancy. *World J Surg*, 39, 453-60.
- KUIJPERS, A. M., HAUPTMANN, M., AALBERS, A. G., NIENHUIJS, S. W., DE HINGH, I. H., WIEZER, M. J., VAN RAMSHORST, B., VAN GINKEL, R. J., HAVENGA, K. & VERWAAL, V. J. 2016. Cytoreduction and

- hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: The learning curve reassessed. *Eur J Surg Oncol*, 42, 244-50.
- KUSAMURA, S., BARATTI, D., VIRZI, S., BONOMI, S., IUSCO, D. R., GRASSI, A., HUTANU, I. & DERACO, M. 2013. Learning curve for cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in peritoneal surface malignancies: analysis of two centres. *J Surg Oncol*, 107, 312-9.
- KWAKMAN, R., SCHRAMA, A. M., VAN OLMEN, J. P., OTTEN, R. H., DE LANGE-DE KLERK, E. S., DE CUBA, E. M., KAZEMIER, G. & TE VELDE, E. A. 2016. Clinicopathological Parameters in Patient Selection for Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy for Colorectal Cancer Metastases: A Meta-analysis. *Ann Surg*, 263, 1102-11.
- KYANG, L. S., ALZHRANI, N. A., VALLE, S. J., RAHMAN, M. K., ARROWAILI, A., LIAUW, W. & MORRIS, D. L. 2019. Long-term survival outcomes of cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: Single-institutional experience with 1225 cases. *J Surg Oncol*, 120, 794-802.
- LADANIE, A., SCHMITT, A. M., SPEICH, B., NAUDET, F., AGARWAL, A., PEREIRA, T. V., SCLAFANI, F., HERBRAND, A. K., BRIEL, M., MARTIN-LIBERAL, J., SCHMID, T., EWALD, H., IOANNIDIS, J. P. A., BUCHER, H. C., KASENDA, B. & HEMKENS, L. G. 2020. Clinical Trial Evidence Supporting US Food and Drug Administration Approval of Novel Cancer Therapies Between 2000 and 2016. *JAMA Netw Open*, 3, e2024406.
- LAKS, S., SCHTRECHMAN, G., ADILEH, M., BEN-YAACOV, A., PURIM, O., IVANOV, V., ADERKA, D., SHACHAM-SHMUELI, E., HALPERN, N., GOREN, S., PERELSON, D. & NISSAN, A. 2021. Repeat Cytoreductive Surgery and Intraperitoneal Chemotherapy for Colorectal Cancer Peritoneal Recurrences is Safe and Efficacious. *Ann Surg Oncol*.
- LAMBERT, L. A. 2015. Looking up: Recent advances in understanding and treating peritoneal carcinomatosis. *CA Cancer J Clin*, 65, 284-98.
- LAMBERT, L. A. & WISEMAN, J. 2018. Palliative Management of Peritoneal Metastases. *Ann Surg Oncol*, 25, 2165-2171.
- LAND, S. R., KOPEC, J. A., CECCHINI, R. S., GANZ, P. A., WIEAND, H. S., COLANGELO, L. H., MURPHY, K., KUEBLER, J. P., SEAY, T. E., NEEDLES, B. M., BEARDEN, J. D., 3RD, COLMAN, L. K., LANIER, K. S., PAJON, E. R., JR., CELLA, D., SMITH, R. E., O'CONNELL, M. J., COSTANTINO, J. P. & WOLMARK, N. 2007. Neurotoxicity from oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: NSABP C-07. *J Clin Oncol*, 25, 2205-11.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF). 2019. *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL* [Online]. Available: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Kolorektales_Karzinom/Version_2/LL_KRK_Langversion_2.1.pdf [Accessed 20.07.2021].

- LEMOINE, L., SUGARBAKER, P. & VAN DER SPEETEN, K. 2016. Pathophysiology of colorectal peritoneal carcinomatosis: Role of the peritoneum. *World J Gastroenterol*, 22, 7692-707.
- LEMOINE, L., THIJSSSEN, E., CARLEER, R., GEBOERS, K., SUGARBAKER, P. & VAN DER SPEETEN, K. 2019. Body surface area-based vs concentration-based perioperative intraperitoneal chemotherapy after optimal cytoreductive surgery in colorectal peritoneal surface malignancy treatment: COBOX trial. *J Surg Oncol*, 119, 999-1010.
- LEUNG, V., HUO, Y. R., LIAUW, W. & MORRIS, D. L. 2017. Oxaliplatin versus Mitomycin C for HIPEC in colorectal cancer peritoneal carcinomatosis. *Eur J Surg Oncol*, 43, 144-149.
- LEUNIG, M., GOETZ, A. E., DELLIAN, M., ZETTERER, G., GAMARRA, F., JAIN, R. K. & MESSMER, K. 1992. Interstitial fluid pressure in solid tumors following hyperthermia: possible correlation with therapeutic response. *Cancer Res*, 52, 487-90.
- LEVINE, E. A., STEWART, J. H. T., SHEN, P., RUSSELL, G. B., LOGGIE, B. L. & VOTANOPOULOS, K. I. 2014. Intraperitoneal chemotherapy for peritoneal surface malignancy: experience with 1,000 patients. *J Am Coll Surg*, 218, 573-85.
- LIAO, C. I., CHOW, S., CHEN, L. M., KAPP, D. S., MANN, A. & CHAN, J. K. 2018. Trends in the incidence of serous fallopian tube, ovarian, and peritoneal cancer in the US. *Gynecol Oncol*, 149, 318-323.
- LIBERALE, G., AMEYE, L. & HENDLISZ, A. 2019. PRODIGE 7 should be interpreted with caution. *Acta Chir Belg*, 119, 263-266.
- LIESENFELD, L. F., HILLEBRECHT, H. C., KLOSE, J., SCHMIDT, T. & SCHNEIDER, M. 2020. Impact of Perfusate Concentration on Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy Efficacy and Toxicity in a Rodent Model. *J Surg Res*, 253, 262-271.
- LIM, C., TORDJMAN, D., GORNET, J. M., NEMETH, J., VALLEUR, P. & POCARD, M. 2010. [Prospective study of quality of life after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy using oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis]. *Bull Cancer*, 97, 1053-60.
- LÖFFLER, M. W., SCHUSTER, H., ZECK, A., QUILITZ, N., WEINREICH, J., TOLIOS, A., HAEN, S. P., HORVATH, P., LOB, S., RAMMENSEE, H. G., KONIGSRAINER, I., KONIGSRAINER, A. & BECKERT, S. 2017. Pharmacodynamics of Oxaliplatin-Derived Platinum Compounds During Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC): An Emerging Aspect Supporting the Rational Design of Treatment Protocols. *Ann Surg Oncol*, 24, 1650-1657.
- LÖFFLER, M. W., SEYFRIED, N., BURKARD, M., OSWALD, B., TOLIOS, A., YURTTAS, C., HERSTER, F., KAUER, J., JÄGER, T., THIEL, K., HAEN, S. P., RAMMENSEE, H.-G., VENTURELLI, S., SCHWAB, M., KÖNIGSRAINER, A. & BECKERT, S. 2019. Short-term oxaliplatin exposure according to established hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) protocols lacks effectiveness in vitro and ex vivo. *bioRxiv*, 709055.
- LOS, G., MUTSAERS, P. H., VAN DER VIJGH, W. J., BALDEW, G. S., DE GRAAF, P. W. & MCVIE, J. G. 1989. Direct diffusion of cis-

- diamminedichloroplatinum(II) in intraperitoneal rat tumors after intraperitoneal chemotherapy: a comparison with systemic chemotherapy. *Cancer Res*, 49, 3380-4.
- LOS, G., SMINIA, P., WONDERGEM, J., MUTSAERS, P. H., HAVEMEN, J., TEN BOKKEL HUIJINK, D., SMALS, O., GONZALEZ-GONZALEZ, D. & MCVIE, J. G. 1991. Optimisation of intraperitoneal cisplatin therapy with regional hyperthermia in rats. *Eur J Cancer*, 27, 472-7.
- LU, Z., TSAI, M., LU, D., WANG, J., WIJNTJES, M. G. & AU, J. L. 2008. Tumor-penetrating microparticles for intraperitoneal therapy of ovarian cancer. *J Pharmacol Exp Ther*, 327, 673-82.
- LUNDHOLT, B. K., SCUDDER, K. M. & PAGLIARO, L. 2003. A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *J Biomol Screen*, 8, 566-70.
- LUO, F. R., WYRICK, S. D. & CHANEY, S. G. 1999. Biotransformations of oxaliplatin in rat blood in vitro. *J Biochem Mol Toxicol*, 13, 159-69.
- MACRI, A., ARCORACI, V., BELGRANO, V., CALDANA, M., CARBONARI, L., CIOPPA, T., DE CIAN, F., DE MANZONI, G., DE SIMONE, M., GIARDINA, C., MUFFATTI, F., ORSENIGO, E., ROBELLA, M., ROVIELLO, F., SALADINO, E., SAMMARTINO, P. & VAIRA, M. 2020. Short-term outcome of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy used as treatment of colo-rectal carcinomatosis: a multicentric study. *Updates Surg*, 72, 163-170.
- MAHTEME, H., VON HEIDEMAN, A., GRUNDMARK, B., THOLANDER, B., PAHLMAN, L., GLIMELIUS, B., LARSSON, R., GRAF, W. & NYGREN, P. 2008. Heterogeneous activity of cytotoxic drugs in patient samples of peritoneal carcinomatosis. *Eur J Surg Oncol*, 34, 547-52.
- MARIN, D., CATALANO, C., BASKI, M., DI MARTINO, M., GEIGER, D., DI GIORGIO, A., SIBIO, S. & PASSARIELLO, R. 2010. 64-Section multi-detector row CT in the preoperative diagnosis of peritoneal carcinomatosis: correlation with histopathological findings. *Abdom Imaging*, 35, 694-700.
- MASEK, V., ANZENBACHEROVA, E., MACHOVA, M., BRABEC, V. & ANZENBACHER, P. 2009. Interaction of antitumor platinum complexes with human liver microsomal cytochromes P450. *Anticancer Drugs*, 20, 305-11.
- MATHE, G., KIDANI, Y., SEGIGUCHI, M., ERIGUCHI, M., FREDJ, G., PEYTAVIN, G., MISSET, J. L., BRIENZA, S., DE VASSALS, F., CHENU, E. & ET AL. 1989. Oxalato-platinum or 1-OHP, a third-generation platinum complex: an experimental and clinical appraisal and preliminary comparison with cis-platinum and carboplatinum. *Biomed Pharmacother*, 43, 237-50.
- MEHTA, A. M., VAN DEN HOVEN, J. M., ROSING, H., HILLEBRAND, M. J., NUIJEN, B., HUITEMA, A. D., BEIJNEN, J. H. & VERWAAL, V. J. 2015. Stability of oxaliplatin in chloride-containing carrier solutions used in hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Int J Pharm*, 479, 23-7.
- MEHTA, A. M., HUITEMA, A. D., BURGER, J. W., BRANDT-KERKHOF, A. R., VAN DEN HEUVEL, S. F. & VERWAAL, V. J. 2017. Standard Clinical Protocol for Bidirectional Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC): Systemic Leucovorin, 5-Fluorouracil, and Heated Intraperitoneal

- Oxaliplatin in a Chloride-Containing Carrier Solution. *Ann Surg Oncol*, 24, 990-997.
- MEYERS, M. A. 1973. Distribution of intra-abdominal malignant seeding: dependency on dynamics of flow of ascitic fluid. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 119, 198-206.
- MIKULA-PIETRASIK, J., URUSKI, P., TYKARSKI, A. & KSIAZEK, K. 2018. The peritoneal "soil" for a cancerous "seed": a comprehensive review of the pathogenesis of intraperitoneal cancer metastases. *Cell Mol Life Sci*, 75, 509-525.
- MITTAL, R., CHANDRAMOHAN, A. & MORAN, B. 2017. Pseudomyxoma peritonei: natural history and treatment. *Int J Hyperthermia*, 33, 511-519.
- MIYAGI, Y., FUJIWARA, K., KIGAWA, J., ITAMOCHI, H., NAGAO, S., AOTANI, E., TERAOKAWA, N., KOHNO, I. & SANKAI GYNECOLOGY STUDY, G. 2005. Intraperitoneal carboplatin infusion may be a pharmacologically more reasonable route than intravenous administration as a systemic chemotherapy. A comparative pharmacokinetic analysis of platinum using a new mathematical model after intraperitoneal vs. intravenous infusion of carboplatin—A Sankai Gynecology Study Group (SGSG) study. *Gynecol Oncol*, 99, 591-6.
- MORALES-SORIANO, R., ESTEVE-PEREZ, N., SEGURA-SAMPEDRO, J. J., CASCALES-CAMPOS, P., BARRIOS, P. & SPANISH GROUP OF PERITONEAL MALIGNANCY, S. 2018. Current practice in cytoreductive surgery and HIPEC for metastatic peritoneal disease: Spanish multicentric survey. *Eur J Surg Oncol*, 44, 228-236.
- NAGOURNEY, R. A., EVANS, S., TRAN, P. H., NAGOURNEY, A. J. & SUGARBAKER, P. H. 2021. Colorectal cancer cells from patients treated with FOLFOX or CAPOX are resistant to oxaliplatin. *Eur J Surg Oncol*, 47, 738-742.
- NARASIMHAN, V., WRIGHT, J. A., CHURCHILL, M., WANG, T., ROSATI, R., LANNAGAN, T. R. M., VRBANAC, L., RICHARDSON, A. B., KOBAYASHI, H., PRICE, T., TYE, G. X. Y., MARKER, J., HEWETT, P. J., FLOOD, M. P., PEREIRA, S., WHITNEY, G. A., MICHAEL, M., TIE, J., MUKHERJEE, S., GRANDORI, C., HERIOT, A. G., WORTHLEY, D. L., RAMSAY, R. G. & WOODS, S. L. 2020. Medium-throughput Drug Screening of Patient-derived Organoids from Colorectal Peritoneal Metastases to Direct Personalized Therapy. *Clin Cancer Res*, 26, 3662-3670.
- O'BRIEN, J., WILSON, I., ORTON, T. & POGNAN, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 267, 5421-6.
- ORELLANA, E. A. & KASINSKI, A. L. 2016. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio Protoc*, 6.
- ORTEGA-DEBALLON, P., FACY, O., JAMBET, S., MAGNIN, G., COTTE, E., BELTRAMO, J. L., CHAUFFERT, B. & RAT, P. 2010. Which method to deliver hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin? An experimental comparison of open and closed techniques. *Ann Surg Oncol*, 17, 1957-63.
- PAGET, S. 1989. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*, 8, 98-101.

- PENDYALA, L. & CREAVER, P. J. 1993. In vitro cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin. *Cancer Res*, 53, 5970-6.
- PESTIEAU, S. R., BELLIVEAU, J. F., GRIFFIN, H., STUART, O. A. & SUGARBAKER, P. H. 2001. Pharmacokinetics of intraperitoneal oxaliplatin: experimental studies. *J Surg Oncol*, 76, 106-14.
- PFANNENBERG, C., KONIGSRAINER, I., ASCHOFF, P., OKSUZ, M. O., ZIEKER, D., BECKERT, S., SYMONS, S., NIESELT, K., GLATZLE, J., WEYHERN, C. V., BRUCHER, B. L., CLAUSSEN, C. D. & KONIGSRAINER, A. 2009. (18)F-FDG-PET/CT to select patients with peritoneal carcinomatosis for cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg Oncol*, 16, 1295-303.
- PICHE, N., LEBLOND, F. A., SIDERIS, L., PICHETTE, V., DROLET, P., FORTIER, L. P., MITCHELL, A. & DUBE, P. 2011. Rationale for heating oxaliplatin for the intraperitoneal treatment of peritoneal carcinomatosis: a study of the effect of heat on intraperitoneal oxaliplatin using a murine model. *Ann Surg*, 254, 138-44.
- PISO, P., GLOCKZIN, G., VON BREITENBUCH, P., SULAIMAN, T., POPP, F., DAHLKE, M., ESQUIVEL, J. & SCHLITT, H. J. 2009. Patient selection for a curative approach to carcinomatosis. *Cancer J*, 15, 236-42.
- PISO, P., NEDELICUT, S. D., RAU, B., KONIGSRAINER, A., GLOCKZIN, G., STROHLEIN, M. A., HORBELT, R. & PELZ, J. 2019. Morbidity and Mortality Following Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy: Data from the DGAV StuDoQ Registry with 2149 Consecutive Patients. *Ann Surg Oncol*, 26, 148-154.
- QUENET, F., GOERE, D., MEHTA, S. S., ROCA, L., DUMONT, F., HESSISSEN, M., SAINT-AUBERT, B. & ELIAS, D. 2011. Results of two bi-institutional prospective studies using intraperitoneal oxaliplatin with or without irinotecan during HIPEC after cytoreductive surgery for colorectal carcinomatosis. *Ann Surg*, 254, 294-301.
- QUENET, F., ELIAS, D., ROCA, L., GOERE, D., GHOUTI, L., POCARD, M., FACY, O., ARVIEUX, C., LORIMIER, G., PEZET, D., MARCHAL, F., LOI, V., MEEUS, P., JUZYNA, B., DE FORGES, H., PAINEAU, J., GLEHEN, O., GROUP, U.-G. & GROUP, B. I. G. R. 2021. Cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus cytoreductive surgery alone for colorectal peritoneal metastases (PRODIGE 7): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 22, 256-266.
- RAU, B., BRANDL, A., PISO, P., PELZ, J., BUSCH, P., DEMTRODER, C., SCHULE, S., SCHLITT, H. J., ROITMAN, M., TEPEL, J., SULKOWSKI, U., UZUNOGLU, F., HUNERBEIN, M., HORBELT, R., STROHLEIN, M., BECKERT, S., KONIGSRAINER, I., KONIGSRAINER, A., PERITONEUM SURFACE ONCOLOGY, G., MEMBERS OF THE STUDO, Q., PERITONEUM REGISTRY OF THE GERMAN SOCIETY FOR, G. & VISCERAL, S. 2020. Peritoneal metastasis in gastric cancer: results from the German database. *Gastric Cancer*, 23, 11-22.
- RAYMOND, E., BUQUET-FAGOT, C., DJELLOUL, S., MESTER, J., CVITKOVIC, E., ALLAIN, P., LOUVET, C. & GESPACH, C. 1997. Antitumor activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the

- thymidylate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast and ovarian cancers. *Anticancer Drugs*, 8, 876-85.
- RAYMOND, E., CHANEY, S. G., TAAMMA, A. & CVITKOVIC, E. 1998. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol*, 9, 1053-71.
- RIETBROEK, R. C., VAN DE VAART, P. J., HAVEMAN, J., BLOMMAERT, F. A., GEERDINK, A., BAKKER, P. J. & VEENHOF, C. H. 1997. Hyperthermia enhances the cytotoxicity and platinum-DNA adduct formation of lobaplatin and oxaliplatin in cultured SW 1573 cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 123, 6-12.
- RIHUETE CARO, C., MANZANEDO, I., PEREIRA, F., CARRION-ALVAREZ, L., SERRANO, A. & PEREZ-VIEJO, E. 2018. Cytoreductive surgery combined with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in patients with gastric cancer and peritoneal carcinomatosis. *Eur J Surg Oncol*, 44, 1805-1810.
- RIXE, O., ORTUZAR, W., ALVAREZ, M., PARKER, R., REED, E., PAULL, K. & FOJO, T. 1996. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol*, 52, 1855-65.
- ROBERTS, D., SCHICK, J., CONWAY, S., BIADÉ, S., LAUB, P. B., STEVENSON, J. P., HAMILTON, T. C., O'DWYER, P. J. & JOHNSON, S. W. 2005. Identification of genes associated with platinum drug sensitivity and resistance in human ovarian cancer cells. *Br J Cancer*, 92, 1149-58.
- ROTHENBERG, M. L., OZA, A. M., BIGELOW, R. H., BERLIN, J. D., MARSHALL, J. L., RAMANATHAN, R. K., HART, L. L., GUPTA, S., GARAY, C. A., BURGER, B. G., LE BAIL, N. & HALLER, D. G. 2003. Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol*, 21, 2059-69.
- RUETH, N. M., MURRAY, S. E., HUDDLESTON, S. J., ABBOTT, A. M., GREENO, E. W., KIRSTEIN, M. N. & TUTTLE, T. M. 2011. Severe electrolyte disturbances after hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: oxaliplatin versus mitomycin C. *Ann Surg Oncol*, 18, 174-80.
- SADEGHI, B., ARVIEUX, C., GLEHEN, O., BEAUJARD, A. C., RIVOIRE, M., BAULIEUX, J., FONTAUMARD, E., BRACHET, A., CAILLOT, J. L., FAURE, J. L., PORCHERON, J., PEIX, J. L., FRANCOIS, Y., VIGNAL, J. & GILLY, F. N. 2000. Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer*, 88, 358-63.
- SAMBUI, Y., DE ANGELIS, I., RANALDI, G., SCARINO, M. L., STAMMATI, A. & ZUCCO, F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol*, 21, 1-26.
- SAMPSON, J. A. 1931. Implantation Peritoneal Carcinomatosis of Ovarian Origin. *Am J Pathol*, 7, 423-444 39.

- SARKAR, A., LANSOM, J., DEY, A., FISHER, O., ALZHRANI, N. & MORRIS, D. L. 2021. Outcomes in cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for maximal volume (PCI 39) appendiceal tumours. *Eur J Surg Oncol*, 47, 1406-1410.
- SCHAAF, L., VAN DER KUIP, H., ZOPF, W., WINTER, S., MUNCH, M., MURDTER, T. E., THON, K. P., STEURER, W., AULITZKY, W. E. & ULMER, C. 2015. A Temperature of 40 degrees C Appears to be a Critical Threshold for Potentiating Cytotoxic Chemotherapy In Vitro and in Peritoneal Carcinomatosis Patients Undergoing HIPEC. *Ann Surg Oncol*, 22 Suppl 3, S758-65.
- SCHMID, I., KRALL, W. J., UITTENBOGAART, C. H., BRAUN, J. & GIORGI, J. V. 1992. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*, 13, 204-8.
- SCHMITZ, S. 2011. *Der Experimentator: Zellkultur*, 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. S. 13-222, 253-265.
- SCHMITZ, S. & DESEL, C. 2018. *Der Experimentator Zellbiologie*, 1. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum. S. 20, 44-49.
- SEGELMAN, J., GRANATH, F., HOLM, T., MACHADO, M., MAHTEME, H. & MARTLING, A. 2012. Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. *Br J Surg*, 99, 699-705.
- SEN, A., CAPITANO, M. L., SPERNYAK, J. A., SCHUECKLER, J. T., THOMAS, S., SINGH, A. K., EVANS, S. S., HYLANDER, B. L. & REPASKY, E. A. 2011. Mild elevation of body temperature reduces tumor interstitial fluid pressure and hypoxia and enhances efficacy of radiotherapy in murine tumor models. *Cancer Res*, 71, 3872-80.
- SERETIS, C. & YOUSSEF, H. 2014. Quality of life after cytoreductive surgery and intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for peritoneal surface malignancies: a systematic review. *Eur J Surg Oncol*, 40, 1605-13.
- SHIU, M. H. & FORTNER, J. G. 1980. Intraperitoneal hyperthermic treatment of implanted peritoneal cancer in rats. *Cancer Res*, 40, 4081-4.
- SHOEMAKER, R. H. 2006. The NC160 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer*, 6, 813-23.
- SIMKENS, G. A., ROVERS, K. P., NIENHUIJS, S. W. & DE HINGH, I. H. 2017. Patient selection for cytoreductive surgery and HIPEC for the treatment of peritoneal metastases from colorectal cancer. *Cancer Manag Res*, 9, 259-266.
- SMEENK, R. M., VERWAAL, V. J., ANTONINI, N. & ZOETMULDER, F. A. 2007. Survival analysis of pseudomyxoma peritonei patients treated by cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg*, 245, 104-9.
- SONG, N., POGUE-GEILE, K. L., GAVIN, P. G., YOTHERS, G., KIM, S. R., JOHNSON, N. L., LIPCHIK, C., ALLEGRA, C. J., PETRELLI, N. J., O'CONNELL, M. J., WOLMARK, N. & PAIK, S. 2016. Clinical Outcome From Oxaliplatin Treatment in Stage II/III Colon Cancer According to Intrinsic Subtypes: Secondary Analysis of NSABP C-07/NRG Oncology Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 2, 1162-9.

- SPILIOTIS, J., HALKIA, E., LIANOS, E., KALANTZI, N., GRIVAS, A., EFSTATHIOU, E. & GIASSAS, S. 2015a. Cytoreductive surgery and HIPEC in recurrent epithelial ovarian cancer: a prospective randomized phase III study. *Ann Surg Oncol*, 22, 1570-5.
- SPILIOTIS, J., HALKIA, E. E., KALANTZI, N., GIASSAS, S., LIANOS, E., EFSTATHIOU, E. & SUGARBAKER, P. H. 2015b. Mapping the location of peritoneal metastases using the peritoneal cancer index and the correlation with overall survival: a retrospective study. *J BUON*, 20 Suppl 1, S64-70.
- SPRATT, J. S., ADCOCK, R. A., MUSKOVIN, M., SHERRILL, W. & MCKEOWN, J. 1980a. Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy. *Cancer Res*, 40, 256-60.
- SPRATT, J. S., ADCOCK, R. A., SHERRILL, W. & TRAVATHEN, S. 1980b. Hyperthermic peritoneal perfusion system in canines. *Cancer Res*, 40, 253-5.
- STEFANOWICZ-HAJDUK, J., ADAMSKA, A., BARTOSZEWSKI, R. & OCHOCKA, J. R. 2016. Reuse of E-plate cell sensor arrays in the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. *Biotechniques*, 61, 117-22.
- STEFFEN, T., JANINA, E., LANA, B., MARKUS, G., OLIVIER, G., DIANE, G., IGNACE, H., YAN, L., BRANDON, M., DAVID, M., POMPILIU, P., CLAUDIO, Q., BEATE, R., PAUL, S., YUTAKA, Y. & MARTIN, P. P. 2020. Patient Selection for Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Patients With Colorectal Cancer: Consensus on Decision Making Among International Experts. *Clin Colorectal Cancer*.
- STEUPERAERT, M., FALVO D'URSO LABATE, G., DEBBAUT, C., DE WEVER, O., VANHOVE, C., CEELLEN, W. & SEGERS, P. 2017. Mathematical modeling of intraperitoneal drug delivery: simulation of drug distribution in a single tumor nodule. *Drug Deliv*, 24, 491-501.
- STEWART, C. L., GLEISNER, A., HALPERN, A., IBRAHIM-ZADA, I., LUNA, R. A., PEARLMAN, N., GAJDOS, C., EDIL, B. & MCCARTER, M. 2018. Implications of Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy Perfusion-Related Hyperglycemia. *Ann Surg Oncol*, 25, 655-659.
- STEWART, J. H. T., SHEN, P., RUSSELL, G., FENSTERMAKER, J., MCWILLIAMS, L., COLDRUN, F. M., LEVINE, K. E., JONES, B. T. & LEVINE, E. A. 2008. A phase I trial of oxaliplatin for intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion for the treatment of peritoneal surface dissemination from colorectal and appendiceal cancers. *Ann Surg Oncol*, 15, 2137-45.
- STOJANOVSKA, V., PRAKASH, M., MCQUADE, R., FRASER, S., APOSTOLOPOULOS, V., SAKKAL, S. & NURGALI, K. 2019. Oxaliplatin Treatment Alters Systemic Immune Responses. *Biomed Res Int*, 2019, 4650695.
- SUGARBAKER, P. H., GIANOLA, F. J., SPEYER, J. C., WESLEY, R., BAROFSKY, I. & MEYERS, C. E. 1985. Prospective, randomized trial of intravenous versus intraperitoneal 5-fluorouracil in patients with advanced primary colon or rectal cancer. *Surgery*, 98, 414-22.
- SUGARBAKER, P. H. 1989. Surgical treatment of peritoneal carcinomatosis: 1988 Du Pont lecture. *Can J Surg*, 32, 164-70.

- SUGARBAKER, P. H. 1995. Peritonectomy procedures. *Ann Surg*, 221, 29-42.
- SUGARBAKER, P. H., STUART, O. A., VIDAL-JOVE, J., PESSAGNO, A. M. & DEBRUIJN, E. A. 1996. Pharmacokinetics of the peritoneal-plasma barrier after systemic mitomycin C administration. *Cancer Treat Res*, 82, 41-52.
- SUGARBAKER, P. H. 1998. Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis. *Semin Surg Oncol*, 14, 254-61.
- SUGARBAKER, P. H. 1999. Management of peritoneal-surface malignancy: the surgeon's role. *Langenbecks Arch Surg*, 384, 576-87.
- SUGARBAKER, P. H. & CHANG, D. 1999. Results of treatment of 385 patients with peritoneal surface spread of appendiceal malignancy. *Ann Surg Oncol*, 6, 727-31.
- SUGARBAKER, P. H., STUART, O. A. & CARMIGNANI, C. P. 2006. Pharmacokinetic changes induced by the volume of chemotherapy solution in patients treated with hyperthermic intraperitoneal mitomycin C. *Cancer Chemother Pharmacol*, 57, 703-8.
- SUGARBAKER, P. H., TURAGA, K. K., ALEXANDER, H. R., JR., DERACO, M. & HESDORFFER, M. 2016. Management of Malignant Peritoneal Mesothelioma Using Cytoreductive Surgery and Perioperative Chemotherapy. *J Oncol Pract*, 12, 928-935.
- SUGARBAKER, P. H. & VAN DER SPEETEN, K. 2016. Surgical technology and pharmacology of hyperthermic perioperative chemotherapy. *J Gastrointest Oncol*, 7, 29-44.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- SUTTON, P. A., O'DWYER, S. T., BARRIUSO, J., AZIZ, O., SELVASEKAR, C. R., RENEHAN, A. G. & WILSON, M. S. 2021. Indications and outcomes for repeat cytoreductive surgery and heated intra-peritoneal chemotherapy in peritoneal surface malignancy. *Surg Oncol*, 38, 101572.
- SYNOLD, T. W., TAKIMOTO, C. H., DOROSHOW, J. H., GANDARA, D., MANI, S., REMICK, S. C., MULKERIN, D. L., HAMILTON, A., SHARMA, S., RAMANATHAN, R. K., LENZ, H. J., GRAHAM, M., LONGMATE, J., KAUFMAN, B. M., IVY, P. & NATIONAL CANCER INSTITUTE ORGAN DYSFUNCTION WORKING, G. 2007. Dose-escalating and pharmacologic study of oxaliplatin in adult cancer patients with impaired hepatic function: a National Cancer Institute Organ Dysfunction Working Group study. *Clin Cancer Res*, 13, 3660-6.
- TAKIMOTO, C. H., GRAHAM, M. A., LOCKWOOD, G., NG, C. M., GOETZ, A., GREENSLADE, D., REMICK, S. C., SHARMA, S., MANI, S., RAMANATHAN, R. K., SYNOLD, T. W., DOROSHOW, J. H., HAMILTON, A., MULKERIN, D. L., IVY, P., EGORIN, M. J. & GREM, J. L. 2007. Oxaliplatin pharmacokinetics and pharmacodynamics in adult cancer patients with impaired renal function. *Clin Cancer Res*, 13, 4832-9.
- TAN, G. H. C., CHIA, C. S., TAN, S. H., SOO, K. C. & TEO, M. C. C. 2018. Early recurrence after cytoreductive surgery (CRS) and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC). *Int J Clin Oncol*, 23, 989-998.

- TESNIERE, A., SCHLEMMER, F., BOIGE, V., KEPP, O., MARTINS, I., GHIRINGHELLI, F., AYMERIC, L., MICHAUD, M., APETOH, L., BARAULT, L., MENDIBOURE, J., PIGNON, J. P., JOOSTE, V., VAN ENDERT, P., DUCREUX, M., ZITVOGEL, L., PIARD, F. & KROEMER, G. 2010. Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene*, 29, 482-91.
- THOMASSEN, I., VAN GESTEL, Y. R., VAN RAMSHORST, B., LUYER, M. D., BOSSCHA, K., NIENHUIJS, S. W., LEMMENS, V. E. & DE HINGH, I. H. 2014a. Peritoneal carcinomatosis of gastric origin: a population-based study on incidence, survival and risk factors. *Int J Cancer*, 134, 622-8.
- THOMASSEN, I., VERHOEVEN, R. H., VAN GESTEL, Y. R., VAN DE WOUW, A. J., LEMMENS, V. E. & DE HINGH, I. H. 2014b. Population-based incidence, treatment and survival of patients with peritoneal metastases of unknown origin. *Eur J Cancer*, 50, 50-6.
- TODD, R. C. & LIPPARD, S. J. 2009. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics*, 1, 280-91.
- TORRES, I. J., LITTERST, C. L. & GUARINO, A. M. 1978. Transport of model compounds across the peritoneal membrane in the rat. *Pharmacology*, 17, 330-40.
- TURAGA, K., LEVINE, E., BARONE, R., STICCA, R., PETRELLI, N., LAMBERT, L., NASH, G., MORSE, M., ADBEL-MISIH, R., ALEXANDER, H. R., ATTIYEH, F., BARTLETT, D., BASTIDAS, A., BLAZER, T., CHU, Q., CHUNG, K., DOMINGUEZ-PARRA, L., ESPAT, N. J., FOSTER, J., FOURNIER, K., GARCIA, R., GOODMAN, M., HANNA, N., HARRISON, L., HOEFER, R., HOLTZMAN, M., KANE, J., LABOW, D., LI, B., LOWY, A., MANSFIELD, P., ONG, E., PAMEIJER, C., PINGPANK, J., QUINONES, M., ROYAL, R., SALT, G., SARDI, A., SHEN, P., SKITZKI, J., SPELLMAN, J., STEWART, J. & ESQUIVEL, J. 2014. Consensus guidelines from The American Society of Peritoneal Surface Malignancies on standardizing the delivery of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in colorectal cancer patients in the United States. *Ann Surg Oncol*, 21, 1501-5.
- UBINK, I., VAN EDEN, W. J., SNAEBJORNSSON, P., KOK, N. F. M., VAN KUIK, J., VAN GREVENSTEIN, W. M. U., LACLE, M. M., SANDERS, J., FIJNEMAN, R. J. A., ELIAS, S. G., BOREL RINKES, I. H. M., AALBERS, A. G. J. & KRANENBURG, O. 2018. Histopathological and molecular classification of colorectal cancer and corresponding peritoneal metastases. *Br J Surg*, 105, e204-e211.
- UBINK, I., BOLHAQUEIRO, A. C. F., ELIAS, S. G., RAATS, D. A. E., CONSTANTINIDES, A., PETERS, N. A., WASSENAAR, E. C. E., DE HINGH, I., ROVERS, K. P., VAN GREVENSTEIN, W. M. U., LACLE, M. M., KOPS, G., BOREL RINKES, I. H. M. & KRANENBURG, O. 2019. Organoids from colorectal peritoneal metastases as a platform for improving hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Br J Surg*, 106, 1404-1414.
- URANO, M., KURODA, M. & NISHIMURA, Y. 1999. For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. *Int J Hyperthermia*, 15, 79-107.

- URANO, M. & LING, C. C. 2002. Thermal enhancement of melphalan and oxaliplatin cytotoxicity in vitro. *Int J Hyperthermia*, 18, 307-15.
- VAN 'T SANT, I., ENGBERSEN, M. P., BHAIROSING, P. A., LAMBREGTS, D. M. J., BEETS-TAN, R. G. H., VAN DRIEL, W. J., AALBERS, A. G. J., KOK, N. F. M. & LAHAYE, M. J. 2020. Diagnostic performance of imaging for the detection of peritoneal metastases: a meta-analysis. *Eur Radiol*, 30, 3101-3112.
- VAN BAAL, J. O., VAN DE VIJVER, K. K., NIEUWLAND, R., VAN NOORDEN, C. J., VAN DRIEL, W. J., STURK, A., KENTER, G. G., RIKKERT, L. G. & LOK, C. A. 2017. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. *Tissue Cell*, 49, 95-105.
- VAN DE SANDE, L., COSYNS, S., WILLAERT, W. & CEELLEN, W. 2020. Albumin-based cancer therapeutics for intraperitoneal drug delivery: a review. *Drug Deliv*, 27, 40-53.
- VAN DE VLASAKKER, V. C. J., LURVINK, R. J., CASHIN, P. H., CEELLEN, W., DERACO, M., GOERE, D., GONZALEZ-MORENO, S., LEHMANN, K., LI, Y., MORAN, B., MORRIS, D. L., PISO, P., QUADROS, C. A., RAU, B., SOMASHEKHAR, S. P., SOMMARIVA, A., VAN DER SPEETEN, K., SPILIOTIS, J., SUGARBAKER, P. H., TEO, M. C. C., VERWAAL, V. J., YONEMURA, Y., GLEHEN, O. & DE HINGH, I. 2021. The impact of PRODIGE 7 on the current worldwide practice of CRS-HIPEC for colorectal peritoneal metastases: A web-based survey and 2021 statement by Peritoneal Surface Oncology Group International (PSOGI). *Eur J Surg Oncol*.
- VAN DEN TEMPEL, N., HORSMAN, M. R. & KANAAR, R. 2016. Improving efficacy of hyperthermia in oncology by exploiting biological mechanisms. *Int J Hyperthermia*, 32, 446-54.
- VAN DER SPEETEN, K., LEMOINE, L. & SUGARBAKER, P. 2017. Overview of the optimal perioperative intraperitoneal chemotherapy regimens used in current clinical practice. *Pleura Peritoneum*, 2, 63-72.
- VAN DRIEL, W. J., KOOLE, S. N., SIKORSKA, K., SCHAGEN VAN LEEUWEN, J. H., SCHREUDER, H. W. R., HERMANS, R. H. M., DE HINGH, I., VAN DER VELDEN, J., ARTS, H. J., MASSUGER, L., AALBERS, A. G. J., VERWAAL, V. J., KIEFFER, J. M., VAN DE VIJVER, K. K., VAN TINTEREN, H., AARONSON, N. K. & SONKE, G. S. 2018. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *N Engl J Med*, 378, 230-240.
- VAN OUDHEUSDEN, T. R., GRULL, H., DANKERS, P. Y. & DE HINGH, I. H. 2015a. Targeting the peritoneum with novel drug delivery systems in peritoneal carcinomatosis: a review of the literature. *Anticancer Res*, 35, 627-34.
- VAN OUDHEUSDEN, T. R., NIENHUIJS, S. W., LUYER, M. D., NIEUWENHUIJZEN, G. A., LEMMENS, V. E., RUTTEN, H. J. & DE HINGH, I. H. 2015b. Incidence and treatment of recurrent disease after cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy for peritoneally metastasized colorectal cancer: A systematic review. *Eur J Surg Oncol*, 41, 1269-77.

- VERGOTE, I., HARTER, P. & CHIVA, L. 2019. Is There a Role for Intraperitoneal Chemotherapy, Including HIPEC, in the Management of Ovarian Cancer? *J Clin Oncol*, 37, 2420-2423.
- VERWAAL, V. J., VAN RUTH, S., DE BREE, E., VAN SLOOTHEN, G. W., VAN TINTEREN, H., BOOT, H. & ZOETMULDER, F. A. 2003. Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 21, 3737-43.
- VERWAAL, V. J., BOOT, H., ALEMAN, B. M., VAN TINTEREN, H. & ZOETMULDER, F. A. 2004. Recurrences after peritoneal carcinomatosis of colorectal origin treated by cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: location, treatment, and outcome. *Ann Surg Oncol*, 11, 375-9.
- VERWAAL, V. J., BRUIN, S., BOOT, H., VAN SLOOTEN, G. & VAN TINTEREN, H. 2008. 8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 15, 2426-32.
- VISANJI, J. M., DUTHIE, S. J., PIRIE, L., THOMPSON, D. G. & PADFIELD, P. J. 2004. Dietary isothiocyanates inhibit Caco-2 cell proliferation and induce G2/M phase cell cycle arrest, DNA damage, and G2/M checkpoint activation. *J Nutr*, 134, 3121-6.
- VOTANOPOULOS, K., IHEMELANDU, C., SHEN, P., STEWART, J., RUSSELL, G. & LEVINE, E. A. 2013. A comparison of hematologic toxicity profiles after heated intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin and mitomycin C. *J Surg Res*, 179, e133-9.
- WANG, R., SONG, S., HARADA, K., GHAZANFARI AMLASHI, F., BADGWELL, B., PIZZI, M. P., XU, Y., ZHAO, W., DONG, X., JIN, J., WANG, Y., SCOTT, A., MA, L., HUO, L., VICENTE, D., BLUM MURPHY, M., SHANBHAG, N., TATLONGHARI, G., THOMAS, I., ROGERS, J., KOBAYASHI, M., VYKOUKAL, J., ESTRELLA, J. S., ROY-CHOWDHURI, S., HAN, G., ZHANG, S., MAO, X., SONG, X., ZHANG, J., GU, J., JOHNSON, R. L., CALIN, G. A., PENG, G., LEE, J. S., HANASH, S. M., FUTREAL, A., WANG, Z., WANG, L. & AJANI, J. A. 2020. Multiplex profiling of peritoneal metastases from gastric adenocarcinoma identified novel targets and molecular subtypes that predict treatment response. *Gut*, 69, 18-31.
- WANG, Y., REN, F., CHEN, P., LIU, S., SONG, Z. & MA, X. 2019. Effects of CytoReductive surgery plus hyperthermic IntraPERitoneal chemotherapy (HIPEC) versus CytoReductive surgery for ovarian cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*, 45, 301-309.
- WHITEHOUSE, H. B. 1927. A Case of Ovarian Carcinoma with Peritoneal Metastases, treated by Transfusion of Maternal Blood and Injections of Radiated Ascitic Fluid. *Proc R Soc Med*, 20, 407-9.
- WILSON, A. P. 1984. Characterization of a cell line derived from the ascites of a patient with papillary serous cystadenocarcinoma of the ovary. *J Natl Cancer Inst*, 72, 513-21.
- WINNER, K. K., STEINKAMP, M. P., LEE, R. J., SWAT, M., MULLER, C. Y., MOSES, M. E., JIANG, Y. & WILSON, B. S. 2016. Spatial Modeling of

- Drug Delivery Routes for Treatment of Disseminated Ovarian Cancer. *Cancer Res*, 76, 1320-1334.
- YAN, T. D., MORRIS, D. L., SHIGEKI, K., DARIO, B. & MARCELLO, D. 2008. Preoperative investigations in the management of peritoneal surface malignancy with cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: Expert consensus statement. *J Surg Oncol*, 98, 224-7.
- YUCE, S., SEKER, M. M., KOC, S., UYSAL, I. O., KACAN, T., DOGAN, M., DOGAN, M., BABACAN, N. A. & KILICKAP, S. 2014. Oxaliplatin and ototoxicity: is it really safe for hearing? *Turk J Med Sci*, 44, 586-9.
- YURTTAS, C., HOFFMANN, G., TOLIOS, A., HAEN, S. P., SCHWAB, M., KONIGSRAINER, I., KONIGSRAINER, A., BECKERT, S. & LÖFFLER, M. W. 2018. Systematic Review of Variations in Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) for Peritoneal Metastasis from Colorectal Cancer. *J Clin Med*, 7.
- YURTTAS, C., FISHER, O. M., CORTÉS-GUIRAL, D., HAEN, S. P., KÖNIGSRAINER, I., KÖNIGSRAINER, A., BECKERT, S., LIAUW, W. & LÖFFLER, M. W. 2020. Cytoreductive surgery and HIPEC in colorectal cancer—did we get hold of the wrong end of the stick? *memo - Magazine of European Medical Oncology*, 13, 434-439.
- ZHANG, G., ZHU, Y., LIU, C., CHAO, G., CUI, R. & ZHANG, Z. 2019. The prognosis impact of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) plus cytoreductive surgery (CRS) in advanced ovarian cancer: the meta-analysis. *J Ovarian Res*, 12, 33.
- ZHANG, S., LOVEJOY, K. S., SHIMA, J. E., LAGPACAN, L. L., SHU, Y., LAPUK, A., CHEN, Y., KOMORI, T., GRAY, J. W., CHEN, X., LIPPARD, S. J. & GIACOMINI, K. M. 2006. Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res*, 66, 8847-57.
- ZHANG, X., WU, Q., WEI, M., DENG, X., GU, C. & WANG, Z. 2020. Oxaliplatin versus mitomycin C in HIPEC for peritoneal metastasis from colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of comparative studies. *Int J Colorectal Dis*, 35, 1831-1839.

7 Veröffentlichungen

Inhalte der Dissertation wurden am 31. Juli 2019 auf dem Preprint Server bioRxiv veröffentlicht:

LÖFFLER, M. W., SEYFRIED, N., BURKARD, M., OSWALD, B., TOLIOS, A., YURTTAS, C., HERSTER, F., KAUER, J., JÄGER, T., THIEL, K., HAEN, S. P., RAMMENSEE, H.-G., VENTURELLI, S., SCHWAB, M., KÖNIGSRAINER, A. & BECKERT, S. 2019. Short-term oxaliplatin exposure according to established hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) protocols lacks effectiveness in vitro and ex vivo. *bioRxiv*, 709055.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/709055>

8 Erklärungen zum Eigenanteil

Die Dissertation wurde am Universitätsklinikum Tübingen, Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie (Kompetenzzentrum für die Chirurgie des Peritoneums der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie) unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Stefan Beckert (Direktor der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Schwarzwald-Baar Klinikum Villingen-Schwenningen) sowie Frau Privatdozentin Dr. med. Karolin Thiel angefertigt.

Die Laborarbeit ist in Tübingen am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung für Immunologie (Lehrstuhlinhaber: Herr Professor Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee) durchgeführt worden. Die Funktion des dortigen Mentors wurde von Herrn Dr. med. Markus W. Löffler übernommen. Unter seiner Leitung ist die Angliederung an die Arbeitsgruppe Chirurgische Immunologie und experimentelle Onkologie erfolgt.

Einschlägige Vorarbeiten zu dem von der AVT zur Verfügung gestellten IPM sowie zu der Methodik der Langzeitversuche bestanden durch (die Publikation von) Herrn Dr. med. Markus W. Löffler (und Herrn Benedikt Oswald). Nach Einarbeitung ist auf dieser Grundlage die Technik der Versuchsdurchführung modifiziert und weitere Verfahrensweisen neu etabliert worden.

Die eingefrorenen Bestände der OAW42 bzw. Caco2 Zellen sind initial durch die Abteilung für Immunologie des Interfakultären Instituts für Zellbiologie Tübingen bzw. von Frau Dr. Latifa Zekri-Metref bereitgestellt worden (s. 2.1.2.1 bzw. 2.1.2.2).

Mit Ausnahme der im Folgenden, unten genannten Erklärungen sind die in der Dissertation erfassten Daten selbst erhoben und sämtliche Experimente von mir eigenständig durchgeführt worden.

Die Überprüfungen auf einen Befall mit Mykoplasmen in der Zellkultur fand selbstständig durch Frau Claudia Falkenburger statt (s. 2.2.1.1).

Eine Kooperation und Zusammenarbeit bestand mit dem Physiologischen Institut des Universitätsklinikums Tübingen, Abteilung für Vegetative und Klinische Physiologie (Kommissarischer Leiter: Herr Professor Dr. rer. nat. Thomas Wieder).

Herr Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Sascha Venturelli und Herr Dr. rer. nat. Markus Burkard haben die analysierten Daten der CTB und SRB ohne meine Mitwirkung erhoben und im Rahmen der gemeinsamen Veröffentlichung zur Verfügung gestellt (s. 3.2.7): Seite 14, „*Figure 4. Cell death after incubation of OAW-42 and HT29 cells with OX spiked into dextrose 5 % in water (D5W) or peritoneal dialysis solution (PDS) for 30 minutes at 42 °C and continuous exposure measured by end point assays.*“, a-c (Löffler et al. 2019).

Nach der selbstständigen Probengewinnung ist die AAS von Oxaliplatin extern im MVZ Dr. Eberhard & Partner Dortmund durchgeführt und die Resultate übermittelt worden (s. 2.2.4 und 3.4).

Die Bedienung des BD FACSCanto II Flow Cytometers sowie die Auswertung mittels FlowJo der Durchflusszytometrie ist zusammen mit Herrn Dr. med. Joseph Kauer erfolgt (s. 2.2.5 und 3.5).

Die Versuche der Mikroskopie sind mithilfe von Frau Dr. rer. nat. Franziska Herster (Messung, Auswertung und Aufnahmen, s. 2.2.6.1, 2.2.6.3, 3.6 und Abbildung 2) sowie mit der Unterstützung von Herrn Jürgen Winter (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, s. 2.2.6.2) vorgenommen worden.

Einzelne Abbildungen wurden gemeinsam mit Herrn Dr. med. Markus W. Löffler erstellt (s. 2.3). Neben den Daten und grafischen Darstellungen war ich an der Verfassung und Korrektur der Veröffentlichung (s. 7) beteiligt. Die Dissertation trägt als Teil dazu bei. Demensprechend sind Inhalte und modifizierte Abbildungen daraus verwendet worden.

Die Auswertung, Interpretation, Diskussion und kritische Überarbeitung dieser Dissertation ist durch die Hilfe meiner Betreuer Herrn Professor Dr. med. Stefan Beckert und Frau Privatdozentin Dr. med. Karolin Thiel sowie meinem Mentor Herrn Dr. med. Markus W. Löffler sichergestellt worden.

Ich versichere, die Dissertation selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Tübingen, den 20. Juli 2021

Nick Seyfried

9 Danksagung

Zunächst möchte ich meinen besonderen Dank Herrn Professor Dr. med. univ. Alfred Königsrainer aussprechen für die Möglichkeit an seiner Universitätsklinik zu promovieren.

Gleichermaßen bin ich Herrn Professor Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee äußerst dankbar dafür, dass ich in seiner renommierten Abteilung meine Labor-tätigkeit habe ausüben dürfen.

An erster Stelle gilt die Danksagung meinen Betreuern Herrn Professor Dr. med. Stefan Beckert sowie Frau Privatdozentin Dr. med. Karolin Thiel für die Konzeption des Themas, die wertvolle fachliche und persönliche Begleitung sowie für die Verwirklichung dieser Dissertation.

Besonderer Hervorhebung bedarf es ebenfalls meinem Mentor Herrn Dr. med. Markus W. Löffler für die unermüdliche Hilfeleistung und den Beistand zu jeder Tages- und Nachtzeit sowie für die konstruktiven Anmerkungen und kritischen Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Weiterhin danke ich ausdrücklich allen Beteiligten, die an dieser Arbeit wesentlich mitgewirkt und beteiligt waren: die Kooperation mit dem Physiologischen Institut des Universitätsklinikums Tübingen durch Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Sascha Venturelli und Herrn Dr. rer. nat. Markus Burkard, dem Team der Abteilung für Immunologie (mit Frau Claudia Falkenburger und Frau Dr. Latifa Zekri-Metref), Frau Dr. rer. nat. Franziska Herster, Herrn Dr. med. Joseph Kauer, Herrn Jürgen Winter, Herrn Benedikt Oswald und Herrn Professor Dr. med. Sebastian Haen[†].

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken: meinen Großeltern, die mich auf meinem Weg stets mit viel Zuspruch und Rat begleiten sowie von Herzen meiner Mutter und meiner Schwester Leonie, die jederzeit an mich geglaubt, mich unermüdlich motiviert, unterstützt und bestärkt haben.

Ihnen möchte ich diese Dissertation widmen.