

Aus der

Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen

**Histon-Deacetylase-Inhibitor Valproinsäure als
Prävention peritonealer Magenkarzinom-Rezidive**

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

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

vorgelegt von

Brauer, Lisa

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Königsrainer
2. Berichterstatter: Professor Dr. PW. Steurer

Tag der Disputation: 07.02.2024

Meinen Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Peritoneale Metastasierung	1
1.2 Magenkarzinom und Therapiemöglichkeiten	2
1.2.1 Intraperitoneale Chemotherapie	3
1.2.2 Durchführung der PIPAC	4
1.2.3 Risiken der PIPAC	5
1.3 Histon-Deacetylase-Inhibitoren	6
1.3.1 Valproinsäure	10
1.4 Paclitaxel	12
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Ethischer und rechtlicher Hintergrund	16
2.2 Material	16
2.2.1 Geräte	16
2.2.2 Zelllinien	17
2.2.3 Assay Kits	18
2.2.4 Chemikalien und Reagenzien	18
2.2.5 Verbrauchsmaterialien	19
2.2.6 Software	21
2.3 Methoden	21
2.3.1 Medikamente	21
2.3.2 Zellkulturmethoden	21
2.3.2.1 Kultivierung von Zellen	22
2.3.2.2 Passagieren	22
2.3.3 Experimentelle Gruppen	23

2.3.4	Medikamentengabe mittels PIPAC _____	24
2.3.5	Zytotoxizitätsassay _____	26
2.3.5.1	CASY-Zellzählung _____	27
2.3.6	MTT-Assay _____	29
2.3.7	Migrationsassay _____	30
2.3.8	Wundheilungsassay _____	31
2.3.9	Adhäsionsassay _____	32
2.3.10	Statistische Auswertung _____	34
3	Ergebnisse _____	35
3.1	Dosisfindung und Zytotoxizität _____	35
3.1.1	Zytotoxischer Effekt von VPA _____	35
3.1.2	Zytotoxischer Effekt von PTX _____	39
3.1.3	Zytotoxischer Effekt von VPA mit PTX in Kombination _____	40
3.2	Metabolische Effekte _____	42
3.2.1	Metabolischer Effekt von VPA _____	42
3.2.2	Metabolischer Effekt von PTX und VPA mit PTX in Kombination _____	44
3.3	Migrationseffekte _____	47
3.3.1	Migrationseffekt von VPA und PTX _____	48
3.3.2	Migrationseffekt von VPA mit PTX in Kombination _____	51
3.4	Wundheilungseffekte _____	53
3.4.1	Wundheilungseffekt von VPA und PTX _____	53
3.5	Adhäsionseffekte _____	57
3.5.1	Adhäsionseffekt von VPA, PTX und deren Kombination _____	58
4	Diskussion _____	60
5	Zusammenfassung _____	68
6	Literaturverzeichnis _____	70
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	77
8	Veröffentlichungen _____	78
9	Danksagung _____	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der PIPAC.....	4
Abbildung 2: Histon-Acetylierung und Deacetylierung.....	6
Abbildung 3: Verschiedene antitumorale Wirkungen der HDACi.....	8
Abbildung 4: Strukturformel von Paclitaxel	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung: PIPAC-Aufbau in vitro.	26
Abbildung 6: Messergebnisse einer CASY-Zellzählung.	28
Abbildung 7: Zytotoxischer Effekt auf MKN-45 Zellen (VPA).....	37
Abbildung 8: Zytotoxischer Effekt auf MKN-45 Zellen (8 mg/ml VPA).	38
Abbildung 9: Zytotoxischer Effekt auf MKN-45 Zellen (PTX).....	40
Abbildung 10: Zytotoxischer Effekt auf MKN-45 Zellen (VPA, PTX, VPA + PTX)	41
Abbildung 11: Metabolischer Effekt auf MKN-45 Zellen (VPA).....	43
Abbildung 12: Metabolischer Effekt auf MKN-45 Zellen (VPA, PTX, VPA + PTX).	45
Abbildung 13: Scratch-Assay mit MKN-45 Zellen (VPA, PTX).	49
Abbildung 14: Hemmung der Migration von MKN-45 Zellen (VPA, PTX).	50
Abbildung 15: Scratch-Assay mit MKN-45 Zellen (VPA).	51
Abbildung 16: Hemmung der Migration von MKN-45 Zellen (VPA + PTX).	52
Abbildung 17: Scratch-Assay mit MKN-45 Zellen (VPA + PTX).	53
Abbildung 18: Wundheilungsassay mit NHDF Zellen (VPA, PTX).....	54
Abbildung 19: Wundheilungsassay mit NHDF Zellen (VPA).	55
Abbildung 20: Wundheilungsassay mit MeT-5A Zellen (VPA, PTX).....	56
Abbildung 21: Wundheilungsassay mit MeT-5A Zellen (VPA).....	57
Abbildung 22: Adhäsionseffekt auf MKN-45 Zellen (VPA, PTX, VPA + PTX)...	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HDAC-Klassifizierung	9
Tabelle 2: HDACi-Stoffklassen und Strukturformel von VPA.....	11
Tabelle 3: Verwendete Gerätschaften	16
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien	17
Tabelle 5: Verwendete Kits.....	18
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	18
Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 8: Verwendete Software	21

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
Ac	Acetylgruppe
bar	Bar
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DE	Deutschland
DMEM	Kulturmedium (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(D)PBS	(Dulbeccos) phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. [Dulbecco's] Phosphate Buffered Saline)
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl. extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-Immuno-Assay (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
engl.	Englisch
et al.	und andere (lateinisch et alii/aliae/alia)
FBS	Fetales Kälberserum (engl. fetal bovine serum)
g	Gramm

GABA	γ -Aminobuttersäure (engl. gamma-aminobutyric acid)
ggf.	gegebenenfalls
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HIPEC	Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
IPC	Intraperitoneale Chemotherapie
m ²	Quadratmeter
MeT-5A	Mesothelzelllinie (engl. mesothelial cells transfected)
mg	Milligramm
min	Minute
MKN-45	Magenkarzinomzelllinie
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NHDF	Fibroblastenzelllinie (engl. normal human dermal fibroblasts)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OP	Operation
p	Wahrscheinlichkeitswert (engl. probability value)
PIPAC	Intraperitoneale Hochdruck-Aerosolchemotherapie (engl. pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy)

psi	Pfund-Kraft pro Quadratzoll (engl. pound-force per square inch)
PTX	Paclitaxel
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
rpm	Umdrehung pro Minute (engl. rounds per minute)
s	Sekunde
SAHA	Suberoylanilid-Hydroxamsäure (engl. suberoylanilide hydroxamic acid)
sog.	sogenannt
U	Einheiten (engl. unified atomic mass unit)
USA	Amerika (engl. United States of America)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. vascular endothelial growth factor)
Vgl.	Vergleich
VPA	Valproinsäure (engl. valproic acid)
vs.	versus
Zn ²⁺	Zink-Ion

1 Einleitung

1.1 Peritoneale Metastasierung

Das Peritoneum, welches auch als Bauchfell bezeichnet wird, kleidet den Bauchraum sowie alle abdominalen Organe aus und hat beim Erwachsenen eine Oberfläche von ungefähr 1,4 m² (Albanese et al., 2009). Das Peritoneum ist eine seröse Membran, deren oberste Schicht sich mikroskopisch aus Mesothelzellen zusammensetzt (Melichar und Freedman, 2002). Es besteht aus zwei Blättern, dem Peritoneum parietale und viszerale. Die Innenseite der Bauchwand wird vom parietalen Peritoneum bedeckt, das viszerale Blatt ist mit den inneren Organen teilweise oder vollständig verbunden. Beide Blätter werden beim Erwachsenen von Peritonealflüssigkeit mit einem Volumen von circa 50 ml bis 100 ml unter physiologischen Bedingungen getrennt.

Das Peritoneum weist zahlreiche wichtige Funktionen auf. Beispielsweise dient die ständig produzierte peritoneale Flüssigkeit, neben der Befeuchtung der Oberflächen, aufgrund der Herabsetzung der Oberflächenreibung der intraabdominalen Organe, auch der Gleitbewegung und dem Abfangen dieser Organe. Außerdem enthält die Peritonealflüssigkeit, abgesehen von Elektrolyten, gelösten Stoffen, Wasser und Proteinen, auch verschiedenste Zellen des Immunsystems wie Makrophagen oder Mastzellen. Eine wichtige Abwehrfunktion besitzen die peritonealen Milchflecken (sog. „milky spots“), die einen ständigen Austausch von lymphatischen und immunologischen Zellen zwischen der Peritonealhöhle und dem Körper ermöglichen. Die Milchflecken finden sich häufig auf dem Omentum majus, einer Fettschürze, die netzförmig vom Colon Transversum und Magen über die Dünndarmschlingen ausgebreitet ist. Daher fungiert das Omentum majus als erste Barriere und Schutz vor lokalen Infektionen und weiteren Erkrankungen.

Durch die anatomische Verbindung des Peritoneums zu den abdominalen Organen kann sich eine Erkrankung von ihrem Ursprungsort weiter peritoneal ausbreiten (Blackburn und Stanton, 2014). Dies trifft besonders auf gastrointestinale und gynäkologische Tumore, wie die Ovarialkarzinome,

kolorektalen Karzinome, Magen- und Appendixkarzinome zu (Sugarbaker, 2019), seltener auch auf Melanome, Bronchial- oder Mammakarzinome (Flanagan et al., 2018). So kommt es im weiteren Krankheitsverlauf bei diesen Malignomen häufig zur Bildung von peritonealen Metastasen. Diese Peritonealmetastasen sind oft diffus, aufgrund der Größe des Peritoneums nicht einfach zu lokalisieren und meist schlecht zugänglich. Eine vollständige chirurgische Resektion ist somit oft unmöglich. Dementsprechend lassen sich Peritonealmetastasen nur mit aufwendigen Maßnahmen behandeln. Außerdem kann es nach erfolgreicher Ersttherapie zu Rezidiven, also wiederauftretenden Metastasen, kommen. In den letzten Jahren wurden neue Therapiemöglichkeiten entwickelt, die Fortschritte in Richtung Heilung versprechen.

1.2 Magenkarzinom und Therapiemöglichkeiten

Das Magenkarzinom gehört zu den Malignomen, bei denen es besonders oft zu einer peritonealen Ausbreitung kommt. Das Magenkarzinom ist weltweit die fünfthäufigste Tumorerkrankung, an der schätzungsweise 760.000 Menschen pro Jahr sterben (GLOBOCAN, 2020). Es gibt regionale Differenzen in der Inzidenz des Magenkarzinoms. Diese Differenzen im Krankheitsauftreten spiegeln dabei lokal ungleich vorherrschende Risikofaktoren, wie die Infektionsrate mit dem Bakterium *Helicobacter pylori*, wider. Deshalb ist Magenkrebs bisher auch häufig im asiatischen Raum anzutreffen (Katoh und Ishikawa, 2021).

Die einzige kurative Option beim Magenkarzinom ist die Gastrektomie mit Lymphadenektomie. Im weiteren Verlauf entwickelt sich jedoch bei einem Großteil der Erkrankten (40-60 %) eine peritoneale Metastasierung (Ikoma et al., 2017, Sugarbaker, 2019). Durch die schwierige Behandlung peritonealer Metastasen liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei weniger als 5 % (Sugarbaker, 2018). Bisher waren Bemühungen, die Ausbreitung einer bereits bestehenden peritonealen Erkrankung einzuschränken, auf Dauer eher erfolglos. Eine Verhinderung der Bildung von Peritonealmetastasen von Magenkarzinomen ist demnach entscheidend.

1.2.1 Intraperitoneale Chemotherapie

Neben der systemischen Chemotherapie besteht ein Ansatz zur Vermeidung eines Peritonealrezidivs darin, die Chemotherapie direkt in das Abdomen zu verabreichen (sog. intraperitoneale Chemotherapie, IPC). Die lokale Medikamentengabe geht mit einer längeren Halbwertszeit und einer längeren Wirkungsdauer einher. Zudem kann durch eine gezielte intraperitoneale Anwendung eine höhere Konzentration im Peritoneum erreicht werden (Dedrick et al., 1978). Gleichzeitig sind die Tumorzellen dem Medikament direkt ausgesetzt. Dagegen zeigt eine systemische Chemotherapie eine eingeschränktere Wirksamkeit auf peritoneale Metastasen, was möglicherweise an der Peritoneum-Plasma-Schranke liegen könnte (Jacquet und Sugarbaker, 1996). Eine intraperitoneale Anwendung hat außerdem den Vorteil, dass die systemische Konzentration des Chemotherapeutikums geringer gehalten werden kann, was somit auch positive Auswirkungen auf die systemische Toxizität mit sich bringt.

Ein Beispiel für eine IPC ist die adjuvante hyperthermische intraperitoneale Chemotherapie (HIPEC). Dieses Verfahren basiert auf der Verabreichung eines erwärmten Chemotherapeutikums in die Bauchhöhle (ca. 43 °C) und setzt eine komplette Zytoreduktion der Tumorherde voraus (Yang et al., 2011). Eine weitere Möglichkeit zur Behandlung eines Peritonealrezidivs ist die intraperitoneale Hochdruck-Aerosolchemotherapie (sog. „pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy“, PIPAC). Eine PIPAC-Behandlung erfordert keine Zytoreduktion und kann in Kombination mit einer systemischen Chemotherapie eingesetzt werden. Hierbei wird durch einen Trokar die Medikamentenlösung unter Druck als Aerosol gleichmäßig in den Bauchraum versprüht. Das Aerosolieren hat eine höhere Eindringtiefe der Medikamente in das Tumorgewebe zur Folge. Somit wird im Vergleich zu HIPEC nur 10 % der Chemotherapiedosis benötigt (Solass et al., 2014). Dieser Umstand führt auch zu einer geringeren systemischen Toxizität, selbst bei einer wiederholten Anwendung der PIPAC. Neben der Möglichkeit einer mehrfachen Anwendung hat die PIPAC gegenüber der HIPEC den Vorteil, dass das minimalinvasive Verfahren atraumatischer ist.

Für die chemotherapeutische Behandlung eines Magenkarzinoms haben sich die Zytostatika Doxorubicin und Cisplatin in der Praxis bewährt (Alyami et al., 2021). So wird etwa in einer multizentrischen randomisierten kontrollierten Studie die Behandlung mittels PIPAC mit niedrig dosiertem Cisplatin und Doxorubicin bei peritonealen Metastasen des Magens untersucht (St. Petersburg State Pavlov Medical University, 2020)

1.2.2 Durchführung der PIPAC

Das Grundprinzip der PIPAC wurde erstmals vor ungefähr 20 Jahren am Tiermodell beschrieben (Reymond et al., 2000). In der darauffolgenden Zeit wurde die Entwicklung der PIPAC immer weiter vorangetrieben und die Behandlung schließlich am Patienten durchgeführt (siehe Abbildung 1). Der gesamte Prozess dauert circa 90 Minuten und wird videodokumentiert.

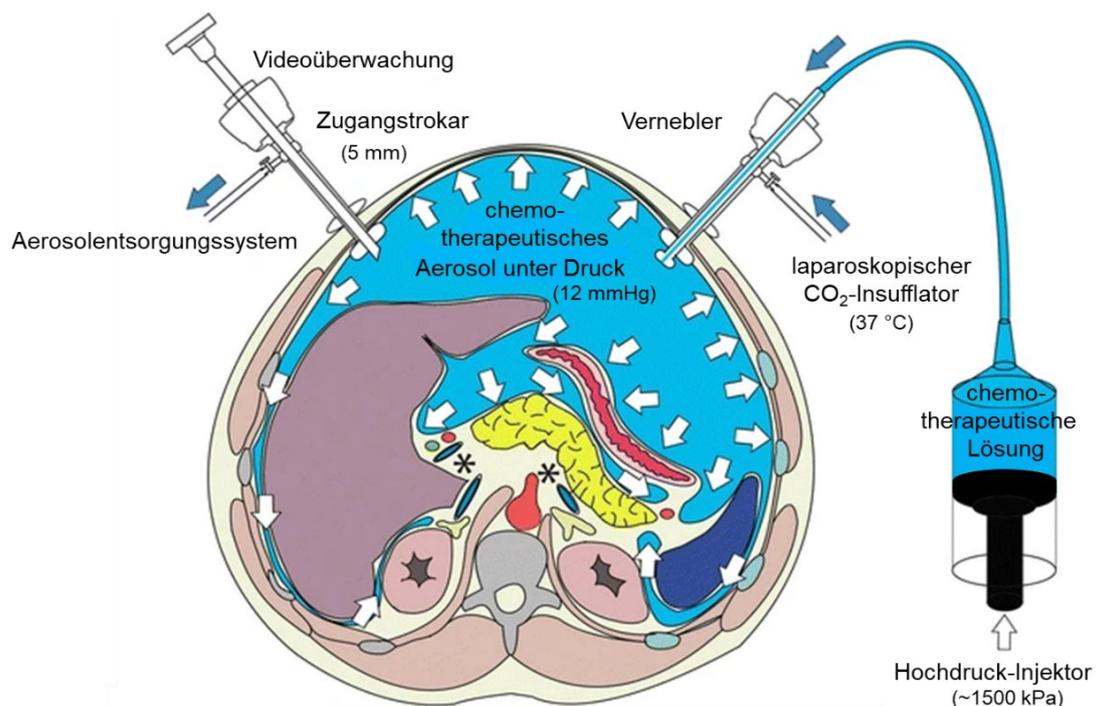


Abbildung 1: Prinzip der PIPAC. Adaptiert nach (Solass et al., 2014).

Chemotherapeutisches Aerosol wird über einen Vernebler unter Druck in den Bauchraum initiiert und wirkt dort für 30 min auf intraperitoneale Tumorzellen. Der gesamte Vorgang wird videüberwacht.

Unter Vollnarkose werden zwei Ballon-Trokare (5 mm und 12 mm) im linken Oberbauch durch die Bauchwand eingeführt. Im Anschluss an die Laparoskopie

mit Bestimmung der Tumorgröße, -lokalisierung, sowie Biopsieentnahme, wird ein CO₂-Capnoperitoneum mit einem Druck von 12 mmHg hergestellt. Nachdem ein Vernebler über einen Trokar in den Bauchraum eingebracht und außerhalb an einen Hochdruck-Injektor angeschlossen wurde, werden die Parameter (eine Flussrate von 30 ml/min und ein maximaler Druck von 20 bar) für die ferngesteuerte und gezielte, normotherme Injektion der Medikamente überprüft. Die Medikamente werden als polydisperses Aerosol in die Peritonealhöhle gesprüht, um eine homogene Verteilung zu ermöglichen (Solass et al., 2014). Das Capnoperitoneum wird für 30 Minuten bei 37 °C im Gleichgewichtszustand (Steady State) aufrechterhalten. Anschließend werden die Trokare entfernt und die Behandlung beendet. Entsprechende Schutzvorrichtungen und geschlossene Entlüftungssysteme verhindern während und nach dem Vorgang das Austreten des toxischen Aerosols in das Umfeld und eine eventuelle Kontamination des OP-Personals.

1.2.3 Risiken der PIPAC

Die Durchführung einer PIPAC zusätzlich zur adjuvanten Standardchemotherapie ist auch mit Risiken verbunden. So kann die Behandlung mit Chemotherapeutika eine Lokaltoxizität haben und die Darmfunktion beeinträchtigen. Auch kann die hohe lokale Konzentration des Chemotherapeutikum nach PIPAC die Wundheilung verzögern und häufiger zu Anastomoseninsuffizienzen führen, wie es am Großtiermodell demonstriert wurde (Tavernier et al., 2020). Darüber hinaus kann die Verabreichung von zytotoxischen Medikamenten im Bauchraum irreversible Schäden am intakten Peritoneum nach sich ziehen, wie z.B. eine Peritonealfibrose. Diese Schäden am intakten Organ sind bei prophylaktischen Indikationen von besonderer Bedeutung (Pocard und Reymond, 2020). Alle diese Aspekte sind nicht förderlich für die Therapie eines malignen Tumors, dessen molekulare Mechanismen chronischen Wunden ähneln (Dvorak, 1986). Es besteht also ein Bedarf an Substanzen, die ein intraperitoneales Tumorrezidiv verhindern, ohne die Wundheilung negativ zu beeinflussen und dem Erhalt des Peritoneums dienen.

Diese anspruchsvolle Aufgabe könnte durch den Einsatz gezielter Inhibitoren wie den Histon-Deacetylase-Enzymen (HDAC) erfüllt werden.

1.3 Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Dass epigenetische Veränderungen eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Malignomen spielen, ist inzwischen gut etabliert. Diese Erkenntnis schließt die Modifikation von Histon-Proteinen im Zellkern durch Acetylierung mit ein. Histone stellen die kleinste Verpackungseinheit von Chromosomen dar. Sie bilden als Komplex ein Nukleosom, um welches sich wiederum der DNA-Strang spiralförmig windet. Für die Vermittlung des Acetylierungs-Prozesses sind spezifische Enzyme verantwortlich. Diese können entweder als Histon-Acetyl-Transferase (HAT) eine Übertragung einer Acetylgruppe auf den positiv geladenen Lysin-Rest am N-terminalen Ende eines Histons oder die Entfernung der Acetylgruppe als sogenannte Histon-Deacetylase (HDAC) initiieren (siehe Abbildung 2) (Kim und Hong, 2015).

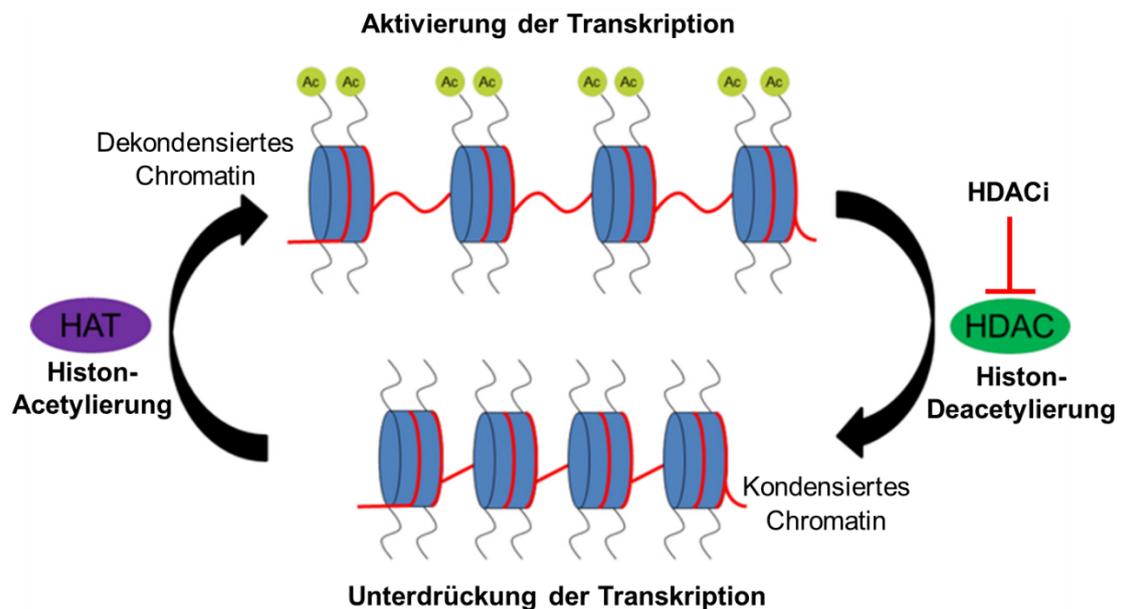


Abbildung 2: Histon-Acetylierung und Deacetylierung.

Adaptiert nach (Kim und Hong, 2015). Ac = Acetylgruppe. Die Histon-Acetyl-Transferase führt über eine Acetylierung des Histons zu decondensiertem Chromatin und folglich zur Transkriptionsaktivierung. Die Histon-Deacetylase hat eine gegenteilige Wirkung, welche durch ihren Enzym-Inhibitor entsprechend blockiert wird.

Es wird angenommen, dass eine Acetylierung zur Neutralisierung des Histons führt, wodurch die Interaktion zwischen der negativ geladenen DNA verringert wird und sich die DNA entspiralisiert. Die Zugänglichkeit der Gene begünstigt dann die Bindung von Transkriptionsfaktoren und folglich die Transkription selbst. Eine Deacetylierung eines Histon-Proteins führt dagegen zu einer Kondensation der DNA und zu einer unterdrückten Genexpression.

Die Hemmung der HDAC-Enzyme durch einen HDAC-Inhibitor (HDACi) kann demnach die DNA-Konformation beeinflussen. Darüber hinaus spielt auch die Acetylierung von Nicht-Histon-Proteinen, wie des Transkriptionsfaktors und Tumorsuppressors p53, eine Rolle bei der epigenetischen Regulierung durch HDACi (Chueh et al., 2015). Insgesamt betrachtet, können die Inhibitoren, in Abhängigkeit vom Tumortyp, somit durch die Expression zahlreicher Gene mehrdimensionale Auswirkungen (siehe Abbildung 3) auf verschiedene Krebsmerkmale wie den Zellzyklus, Zellwachstum, Apoptose, Angiogenese oder die Regulierung zellulärer Signalwege hervorrufen und auch die Immunantwort steuern (Xu et al., 2007, Schizas et al., 2020, Eckschlager et al., 2017). Es wurde zudem festgestellt, dass eine Vorbehandlung von Magenkarzinomzellen mit einem HDACi zu einer erhöhten Konzentration an DNA-gebundenem Chemotherapeutikum führen kann, die mit einer verstärkten Histon-Acetylierung, Chromatinrelaxation und einem Zellzyklusstillstand einhergeht (Amnekar et al., 2020).

Folglich bieten HDACi durch die Veränderung von Expressionsmustern tumorrelevanter Gene sowohl in alleiniger Anwendung als auch in Kombination mit anderen Medikamenten neue therapeutische Optionen zur Krebsbehandlung. Der Einsatz von HDACi beim Magenkarzinom erscheint besonders attraktiv, da das Wiederauftreten peritonealer Metastasen nach kurativer Chirurgie ein ungelöstes Problem darstellt.

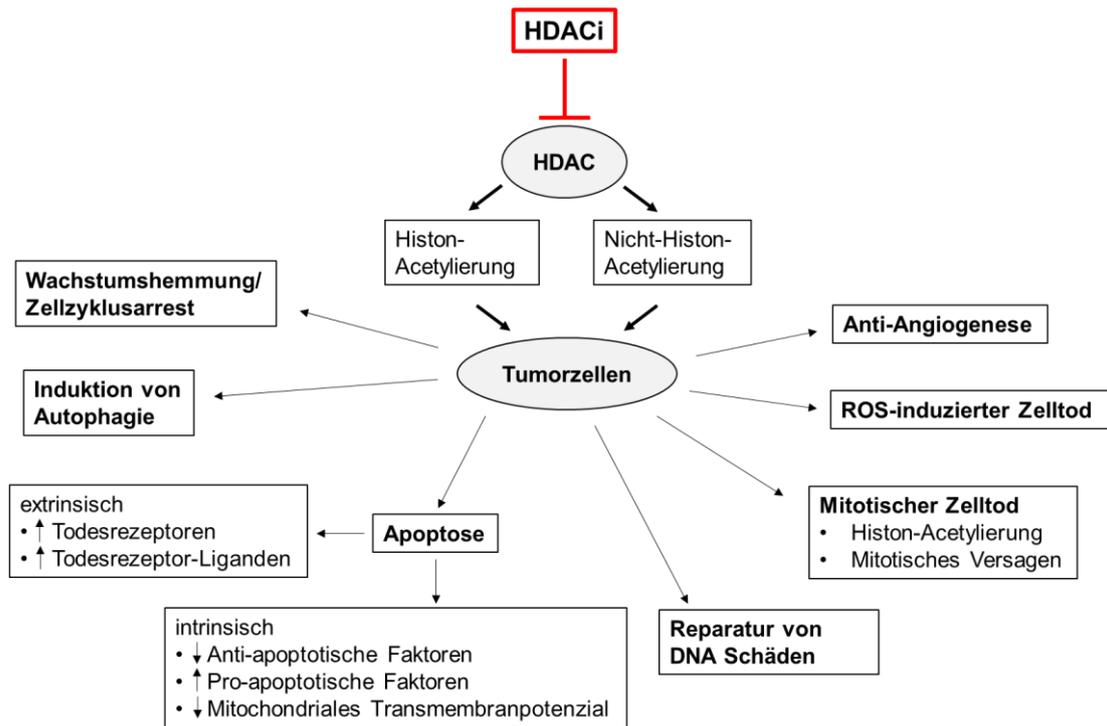


Abbildung 3: Verschiedene antitumorale Wirkungen der HDACi. Adaptiert nach (Xu et al., 2007). Pfeil ↓: Abnahme, Pfeil ↑: Zunahme, ROS: reaktive Sauerstoffspezies. Die Unterdrückung der Histon-Deacetylase aufgrund eines HDAC-Inhibitors führt bei Tumorzellen über die (Nicht-)Histon-Acetylierung zu multiplen Beeinträchtigungen, die beispielsweise im Zusammenhang mit Zellwachstum, Zellzyklus, Autophagie und Apoptose stehen.

Es existieren insgesamt 18 verschiedene HDAC-Isoformen, die nach phylogenetischer Analyse anhand ihrer Homologie zu Proteinen von Hefebakterien in vier Klassen unterteilt werden und sich überwiegend im Zellkern oder Zytoplasma befinden (siehe Tabelle 1). Dabei umfasst die Klasse I die HDAC-Typen 1, 2, 3 und 8. Die Klasse II differenziert sich nach der jeweiligen Anzahl katalytischer Zentren in die Untergruppe IIa mit dem HDAC-Enzym 4, 5, 7, und 9 (ein aktives Zentrum) und in Gruppe IIb mit HDAC 6 und HDAC 10 (zwei aktive Epitope). Klasse IV beinhaltet lediglich eine einzige und jüngst entdeckte Isoform, das HDAC-Enzym 11. Es teilt strukturelle Eigenschaften sowohl mit den HDAC's der Klasse I als auch der Klasse II. Die dritte Klasse stellt die Familie der Sirtuine dar. Diese unterscheidet sich aufgrund dem NAD⁺-abhängigen Deacetylierungs-Mechanismus von den anderen HDAC-Klassen. Für die enzymatische Reaktion der Klassen I, II und IV werden stattdessen Zink-Ionen benötigt (Gregoretti et al., 2004, Gao et al., 2002, Yang et al., 2019).

Tabelle 1: HDAC-Klassifizierung

Klasse	HDAC	Lokalisierung	Mechanismus
I	1, 2, 3, 8	v.a. Zellkern	Zn ²⁺ -abhängig
Ila	4, 5, 7, 9	Zellkern/ Zytoplasma	Zn ²⁺ -abhängig
Ilb	6, 10	v.a. Zytoplasma	Zn ²⁺ -abhängig
III	Sirtuin 1 - 7	Zellkern/ Zytoplasma/ Mitochondrien (je nach Sirtuin)	NAD ⁺ -abhängig
IV	11	Zellkern/ Zytoplasma	Zn ²⁺ -abhängig

Gene, die für eine gesunde Entwicklung erforderlich sind, können durch eine gestörte Funktion der HDAC's zur Malignomentwicklung führen. Daher wurde bei vielen Krebsarten eine verstärkte Expression von HDAC's beobachtet, wie beispielsweise HDAC 1 beim Prostatakarzinom (Halkidou et al., 2004) oder HDAC 2 beim Zervixkarzinom (Huang et al., 2005). Schon vor 20 Jahren wurde eine Überexpression der HDAC-Proteinen 1 und 2 beim Magenkarzinom beschrieben (Choi et al., 2001, Song et al., 2005, Zhang et al., 2019, Yagi et al., 2010). Auch bei szirrhösen Magenkrebszelllinien mit großem peritonealen Metastasierungspotenzial, war etwa die Expression von HDAC 1 und HDAC 2 erhöht, verglichen mit weniger aggressiven Zelllinien (Yagi et al., 2010). Bei der in dieser Studie verwendeten Magenkarzinomzelllinie MKN-45 war eine hohe Expression besonders von HDAC 1 Enzymen nachweisbar (Mutze et al., 2010).

Neben den HDAC-Klassen gibt es auch verschiedene HDACi-Einteilungen. Sogenannte Paninhibitoren könnten bezüglich ihrer Wirkung aufgrund der großflächigen Hemmung von HDAC's mit gegebenenfalls anderen oder gegensätzlichen Funktionen schwer einsetzbar sein. Dagegen haben isoform- oder klassenselektive HDACi, durch die Spezifikation gegenüber nur wenigen HDAC's, vermutlich eine höhere Bindungsaffinität. Sie könnten therapeutisch wirkungsvoller sein und weniger Nebenwirkungen auslösen (Bieliauskas und Pflum, 2008, Khan et al., 2008).

Die obigen Daten legen nahe, dass HDACi zur Behandlung von Peritonealmetastasen eines Magenkarzinoms besonders die HDAC-Klasse I mit den Enzymen 1 und 2 hemmen sollten. Zu den HDAC-Klasse I hemmenden HDACi gehören zum einen z.B. der HDACi SAHA und zum anderen die Valproinsäure (VPA). Im Gegensatz zu SAHA ist VPA kein Paninhibitor, der unspezifisch mehrere HDAC's hemmen kann, sondern ein klassenselektiver Inhibitor (Bieliauskas und Pflum, 2008, Khan et al., 2008). VPA scheint also ein vielversprechender Kandidat für die Prävention von Peritonealmetastasen zu sein. Über die Anwendung von VPA als selektiver HDACi in Bezug auf Magentumore oder peritoneale Rezidive ist bisher allerdings noch wenig bekannt.

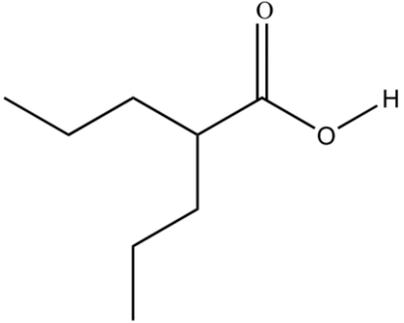
1.3.1 Valproinsäure

VPA ist ein altbewährtes Antiepileptikum, das auch bei Krampfanfällen, bipolaren Störungen und zur Vorbeugung von Migräne eingesetzt wird. Seine neurologischen Effekte beruhen auf einer verstärkten Wirkung des Neurotransmitters GABA durch die Hemmung des GABA-Metabolismus, durch dessen Synthesestimulation und die Blockierung von Natrium- und Calciumkanälen (mit resultierender Verhinderung der Bildung eines Aktionspotenzials). Zu den medikamentösen Nebenwirkungen zählen unter anderem Benommenheit, Schwindel, gastrointestinale Beschwerden, Tremor, Blutgerinnungstörungen, Thrombozytopenie und Hepatotoxizität. Die Anwendung von VPA ist bei werdenden Müttern aufgrund teratogener Eigenschaften untersagt.

Bei dem Wirkstoff handelt es sich um eine Carbonsäure. Als kurzkettige 2n-Propyl-Pentan-Fettsäure gehört VPA zudem zu der Stoffklassengruppe II von HDACi's, von denen insgesamt fünf verschiedene chemische Gruppen (siehe Tabelle 2) differenziert werden (Schizas et al., 2020). VPA ist bei Raumtemperatur eine chemisch stabile Flüssigkeit, in organischen Lösungen löslich und hat eine gute Bioverfügbarkeit (Johno et al., 1984). Seine Löslichkeit in Wasser und Fett ermöglicht eine leichte Verteilung im Körper (Lipska et al., 2020). VPA wird gut durch die einschichtige Peritonealmembran in das

retroperitoneale Fettgewebe absorbiert (Johno et al., 1984). Die pharmakologischen Eigenschaften machen VPA für eine intraperitoneale Verabreichung, wie mit der PIPAC-Technik, attraktiv.

Table 2: HDACi-Stoffklassen und Strukturformel von VPA

	Stoffklasse	
I	Hydroxansäuren	 <p style="text-align: center;">Valproinsäure</p>
II	Kurzkettige Fettsäuren	
III	Benzamide	
IV	Zyklische Tetrapeptide	
V	Sirtuin-Inhibitor	

Langjährige Behandlungserfahrungen machten VPA zu einem verträglichen und von Patienten gut akzeptierten Medikament (Lipska et al., 2020, Duenas-Gonzalez et al., 2008). Bei den zahlreichen behandelten Patienten wurde zufällig beobachtet, dass VPA zusätzlich inhibitorische Effekte hat, die gegen HIV-Infektionen genutzt werden können (Lehrman et al., 2005). Auch bei verschiedenen Tumorarten konnte VPA vielfältige Auswirkungen erzielen (Brodie und Brandes, 2014).

- **VPA als Krebsmittel**

Studien verdeutlichten, dass VPA als HDACi vor allem die HDAC-Klassen I und IIa beeinträchtigen kann (Gurvich et al., 2004). In Anbetracht dessen ist VPA ein potenzielles Therapeutikum für die Prophylaxe oder die Behandlung von peritonealen Magenkrebsrezidiven. VPA reduziert das Tumorwachstum und die Verbreitung durch Metastasierung (Göttlicher et al., 2001). Zusätzlich verringert VPA die Zellproliferation und die Migrationsfähigkeit von Magenkarzinomzellen (Jahani et al., 2021). So konnte etwa bei Magenkarzinomzellen in der G1-Phase des Zellzyklus ein VPA-induzierter Stillstand erkannt werden. Des Weiteren kann VPA die Apoptose von Magenkarzinomzellen induzieren. Gründe hierfür könnten eine Aktivierung der Caspase 9 und 3 (intrinsischer Weg) sowie der Caspase 8

(extrinsischer Weg) sein (Zhao et al., 2011). Auch eine induzierte Autophagie könnte ursächlich sein (Sun et al., 2020). Außerdem löste VPA bei szirrhösem Magenkrebs unter anderem eine Hochregulierung des Proteins p21 mit folgender Einleitung eines Zellzyklusarrests aus. Zudem rief VPA eine Abnahme von Cyclin D1 hervor, welches in Tumoren oft durch seine Überexpression zu Veränderungen der Zellzyklusprogression und Zelltransformationen führt, sowie zur Verringerung des Anti-Apoptoseproteins Survivin (Yagi et al., 2010).

- **Effekt von VPA auf die Wundheilung**

Im Gegensatz zu den meisten Chemotherapeutika scheint VPA die Wundheilung nicht zu beeinträchtigen. In Untersuchungen von Ala et al. konnte sogar ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden. VPA konnte hier die sekundäre Heilung der Haut bei Ratten beschleunigen. Die Autoren vermuten einen GABA- und HDAC-abhängigen Mechanismus als Ursache (Ala et al., 2020). Außerdem unterdrückte VPA die Peritonealfibrose bei Ratten. Zudem konnte nachweislich die Neoangiogenese und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen (Tumornekrosefaktoren, Interleukine, Chemokine) durch VPA reduziert werden (Costalonga et al., 2017). In einem anderen Rattenmodell reduzierte die intraoperative Verabreichung von VPA die intraabdominale Adhäsionsbildung. Während des Versuchs wurde das peritoneale fibrinolytische System wegen verringerter Proteinspiegel von Fibrinogen und VEGF durch VPA nicht beeinträchtigt (Cassidy et al., 2014).

- **Synergie von VPA mit Chemotherapeutika**

Neben einem möglichen Wundheilungseffekt kann VPA in Verbindung mit einem Chemotherapeutikum einen synergistischen, chemosensibilisierenden Einfluss auf Magenkarzinomzellen erzeugen, wie bereits Kombinationen mit Cisplatin oder Oxaliplatin an Magenkarzinomzellen zeigten (Amnekar et al., 2020, Zhang et al., 2019).

1.4 Paclitaxel

Paclitaxel wird als Chemotherapeutikum bei zahlreichen Malignomen angewendet. Dazu gehören metastasiertes Mamma- (Miller et al., 2007) und Pankreaskarzinom (Takahara et al., 2021), Bronchial- (Sandler et al., 2006) oder

Ovarialkarzinom (Armstrong et al., 2006). Als Taxan (siehe Abbildung 4) beruht die medikamentöse Wirkung von Paclitaxel auf der Blockade der G2- und Mitose-Phase des Zellzyklus. Das Zytostatikum hemmt durch die Bindung an β -Tubulin zum einen die Depolymerisation von Tubulin mit resultierender Tubulin-Stabilisierung. Zum anderen verhindert es den Abbau der Mikrotubuli und damit der Mitosespindel, sodass die Zellteilung unterbrochen wird. PTX fällt deshalb in die Gruppe der Zytoskelett-Inhibitoren. PTX kann weiterhin die physiologische Struktur und Funktion der Mikrotubuli durch seinen Eingriff in die Interphase stören, was Wachstum und Stoffwechsel beeinträchtigt und folglich zur Apoptose führt. Unerwünschte Nebenwirkungen können zum Beispiel Neutropenie, gastrointestinale Beeinträchtigungen oder Neuropathie sein.

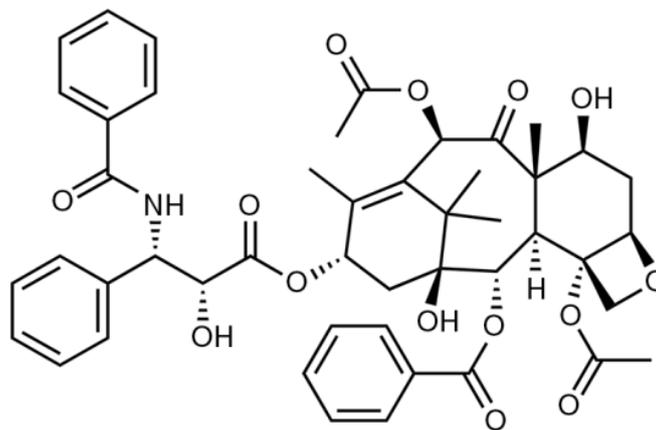


Abbildung 4: Strukturformel von Paclitaxel (Naderi et al., 2015).

PTX wurde aufgrund seiner pharmakokinetischen Eigenschaften mittlerweile bei Peritonealmetastasen gastrischen Ursprunges eingesetzt und zeigte vielversprechende klinische Effekte. Da Taxane wegen ihres höheren Molekulargewichtes und ihrer geringen Löslichkeit eine lange intraperitoneale Verweildauer haben, kann die Aufrechterhaltung einer hohen Medikamentenkonzentration und ein direktes Eindringen in die Tumorzellen gewährleistet werden (Sugarbaker, 2021, Kobayashi und Kodera, 2017, Gelmon, 1994). Bei der Umsetzung einer PIPAC am Schweinemodell zeigte PTX eine geringere systemische Exposition im Vergleich zur intravenösen Therapie und zudem ein günstiges Toxizitätsprofil (Tan et al., 2021). In einer laufenden Phase

I Studie werden Magentumorpatienten mit Peritonealmetastasen mit PTX mittels PIPAC und gleichzeitiger systemischer Chemotherapie behandelt (Kim, 2021).

Ein Hindernis stellt allerdings, wie so oft in der Krebstherapie, die Entwicklung einer PTX-Resistenz dar. Mechanismen, die zur PTX-Resistenz beitragen, sind eine Expression von Multidrug-Resistenzgenen (wie z.B. MDR-1 Gen oder p-Glykoprotein), molekulare Veränderungen von β -Tubulin und die Beeinträchtigung apoptotischer Regulierungs- und Mitose-Kontrollpunkt-Proteine (Yusuf et al., 2003).

- **Synergie von VPA mit Paclitaxel**

Die Kombination von PTX mit einem HDACi erscheint vielversprechend, um chemosensibilisierende und synergetische Effekte auf Tumorzellen zu bewirken (Liu et al., 2014). Eine Kombination von PTX mit VPA wurde bereits an Magenkarzinomzellen getestet. Diese in vitro Studie zeigte, dass VPA mit PTX eine synergistische Wirkung aufgrund einer induzierten α -Tubulin-Acetylierung mit sich daraus ergebender Tubulin-Stabilisierung hat (Yagi et al., 2010). Trotz der zuvor beschriebenen Studien ist die Datenlage in diesem Bereich eher begrenzt, weshalb es weiterer Experimente bedarf. Dementsprechend soll PTX in dieser Studie für die Arzneimittelkombination mit VPA verwendet werden.

Zusammenfassend könnte die Wirkung von VPA die Entzündung, Angio- und Fibrinogenese und das Tumorwachstum in chirurgischen Wunden verringern. Die genauen molekularen Mechanismen, die die VPA-Effekte beim Magenkarzinom modulieren, müssen jedoch noch geklärt werden (Jahani et al., 2021). Insgesamt zeigt VPA neben seinen positiven pharmakologischen Eigenschaften eine Antitumorwirkung und eine fehlende Beeinträchtigung der Wundheilung. Somit ist VPA ein attraktiver Kandidat zur Verhinderung eines intraperitonealen Tumorrezidivs nach einer Magenkarzinom-Operation.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen die Effekte von VPA auf verschiedenste Krebsparameter in vitro analysiert werden. Dabei wird angenommen, dass VPA eine Toxizität auf Magenkrebszellen ausübt, Metabolismus, Zellmigration und Adhäsion beeinflusst und keine negative Beeinträchtigung der Wundheilung

verursacht. Zusätzlich sollen synergistische Effekte durch eine Kombination von VPA und PTX an genannten Tumormerkmalen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Ethischer und rechtlicher Hintergrund

Das Studienprotokoll wurde am 12. Mai 2021 von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, Deutschland, genehmigt (PVL964). Für diese Studie wurden keine lebenden Tiere verwendet oder euthanasiert, und keine humanen Proben entnommen. Es wurden ausschließlich kommerziell erworbene Zelllinien verwendet.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Gerätschaften

Gerät	Hersteller
Einkanalpipette Referenz, mechanisch, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Gefrierschrank	Liebherr (DE)
Gefrierbehälter, Kryotechnik	Taylor Wharton (USA)
Hochdruck-Angioinjektor Accutron HP-D	MedTron AG (Saarbrücken, DE)
Inkubator HERAcCell VIOS 160i, CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific (Schwerte, DE)
Inkubator-Mikroskop zenCell owl	OLS, OMNI Life Science (Bremen, DE)
Kühlschrank 1	Liebherr (DE)
Kühlschrank 2	Philipp Kirsch (Willstätt-Sand, DE)
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems (Wetzlar, DE)
Lichtmikroskop Kamera Leica MC170 HD	Leica Microsystems (Heerbrugg, Schweiz)
Magnetrührer RH basic 2	IKA (Staufen, DE)
Magnetstäbchen Rotilabo	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Magnetstab-Entferner Rotilabo	Carl Roth (Karlsruhe, DE)

Mehrkanalpipette Research, mechanisch, 8-Kanal, 10 – 100 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Mehrkanalpipette Research plus, mechanisch, 8-Kanal, 30 – 300 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Mikroplattenlesegerät NanoQuant Infinite M200 Pro	Tecan Austria GmbH (Grödig, Österreich)
Mini-Membran-Vakuumpumpe Laboport N 811	KNF (Freiburg, DE)
Multipipette Plus	Eppendorf (Hamburg, DE)
Orbitalschüttler PSU-10i	Grant-bio (Cambridge, England)
Pipettierhilfe Pipetus, 0,1 - 200 ml, Akku-betrieben	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, DE)
Rotator Roto-Mix, 10 – 60 rpm	neoLab (Heidelberg, DE)
Röhrchen-Rotator	Thermo Scientific (China)
Schüttelwasserbad SW-20C	Julabo (Seelbach, DE)
Sicherheitswerkbank 1, Klasse 2, Maxisafe 2020 1.8	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, DE)
Touch Screen Accutron HP-D	MedTron AG (Saarbrücken, DE)
Überkopf-Rotationsgerät (Overhead Rotator)	neoLab (Heidelberg, DE)
Zellzähler & Analysator CASY Model TT	Innovatis, Schärfe System (Reutlingen, DE)
Zentrifuge Model 5810 R	Eppendorf (Hamburg, DE)

2.2.2 Zelllinien

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Hersteller
MeT-5A	Humane Mesothelzelllinie	ATCC (Wesel, DE)
MKN-45	Humane Magenkrebszellen, Adenokarzinomzelllinie	DSMZ (Heidelberg, DE)

NHDF	Neonatale humane dermale Fibroblasten	Bioproducts Boehringer Ingelheim (Leimen, DE)
------	---------------------------------------	---

2.2.3 Assay Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits

Kits	Hersteller
CytoSelect 48-well Cell Adhesion Assay, ECM Array, Colorimetric <ul style="list-style-type: none"> • ECM Adhesion Plate (48-well, 40 ECM-proteinbeschichtete wells: Fibronectin, Kollagen IV, Fibrinogen, Laminin I, Kollagen I), 8 BSA-beschichtete wells) • Cell Stain Solution • Extraction Solution 	Cell Biolabs, INC. (Kalifornien, USA)
TACS MTT Cell Proliferation Assay <ul style="list-style-type: none"> • Detergent Reagent • MTT Reagent 	R&D Systems (Minnesota, USA)

2.2.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien & Reagenzien	Hersteller (Ort)
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt, DE)
0,9 % NaCl Infusion Solution	Fresenius Kabi (Bad Homburg, DE)
Amphotericin B	Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt, DE)
Ampuwa Lösungsmittel, steriles und pyrogenfreies, Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi (Bad Homburg, DE)

CASYton	OLS, OMNI Life Science (Bremen, DE)
DPBS, ohne Calcium, ohne Magnesium (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt, DE)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + GlutaMAX-I (4,5 g/l D-glucose)	Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt, DE)
FBS (Fetal Bovine Serum), Qualified	Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt, DE)
NeoTaxan (Paclitaxel), 6 mg/ml	Hexal AG (Holzkirchen, DE)
Penicillin-Streptomycin	Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt, DE)
RPMI 1640 + GlutaMAX-I	Gibco/Life Technologies GmbH (Darmstadt, DE)
Valproic Acid (Valproinsäure), 1 g	Sigma-Aldrich/ Merck (München, DE)

2.2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
24-well-Platten	Cellstar/Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
96-well-Platten, flacher Boden	Cellstar/Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Aufbewahrungsbox	Curver (Neu-Isenburg, DE)
Becher mit Schraubdeckel, 100 ml, strahlensteril	neoLab (Heidelberg, DE)
CapnoPen (Vernebler)	Capnopharm (Tübingen, DE)
CASYcup	OLS, OMNI Life Science (Bremen, DE)
Celldisk, 4 Layeres	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Combitips advanced, 10 ml	Eppendorf (Hamburg, DE)

Culture flask, 175 cm ²	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Doppel-Ballon-Trokar, 12 mmHg	Kii, Applied Medical (Kalifornien, USA)
Easy Loading Syringe (Injektionsspritze), 200 ml, 83 bar, 1200 psi	MedTron AG (Saarbrücken, DE)
Eppendorf Safe-Lock Tube, 2 ml	Eppendorf (Hamburg, DE)
Frischhaltedose Clip&Close, rechteckig (33 x 22 x 21 cm)	Emsa (Emsdetten, DE)
Kryoröhrchen, 1,8 ml	Thermo Scientific Nunc (Schwerte, DE)
Mehrzweckbecher, PP, 200 ml, Schraubverschluss, sterilisiert	Ratiolab (Dreieich, DE)
Pasteurpipette, Glas, 150 mm	Wilhelm Ulbrich (Mainz, DE)
Patientenschlauch (83 bar, 1200 psi,	MedTron AG (Saarbrücken, DE)
Pipettenspitzen epTIPS Reloads, 20 – 300 µl	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipettenspitzen Safeguard, steril, 10 µl, 1000 µl	Peqlab/ VWR (Bruchsal, DE)
Pipettenspitzen TipOne, steril, 100 µl	Starlab (Hamburg, DE)
Pipettenspitze Universal, steril, 200 – 1000 µl, blau	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Pipettenspitze Universal, steril, 10 – 100 µl, gelb	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Polypropylene Conical Centrifuge Tube, 50 ml	Corning/ Falcon (New York, USA)
Reagenz-Reservoir, steril, 25 ml	Moonlab plastics/ neoLab (Heidelberg, DE)
Serologische Pipetten, steril, non pyrogenic, 5, 10, 25, 50 ml	Corning/ Falcon (North Carolina, USA)

2.2.6 Software

Tabelle 8: Verwendete Software

Software/ Version	Hersteller
CASYworX, Version 1.26	OLS, OMNI Life Science (DE)
GraphPad Prism, Version 9.1.2	GraphPad Software Inc. (USA)
IBM SPSS Statistics, Version 28.0.0.0	International Business Machines Corporation (USA)
ImageJ, Version 1.53k	National Institutes of Health (USA)
Leica Application Suite, Version 4.12	Leica Microsystems (Schweiz)
Magellan, Version 7.1	Tecan Trading AG (Schweiz)
Microsoft Excel, Version 2112	Microsoft Corporation (USA)
Microsoft Paint, Version 1703	Microsoft Corporation (USA)
zenCell owl, Version 3.3.2	innoME GmbH (USA)

2.3 Methoden

2.3.1 *Medikamente*

Folgende Substanzen wurden verwendet: Valproinsäure (Valproic acid) von der Firma Sigma-Aldrich und Paclitaxel als NeoTaxan der Hexal AG. Als Kontrolllösung wurde 0,9 % Natriumchlorid (NaCl) eingesetzt.

2.3.2 *Zellkulturmethoden*

Für die in vitro Versuche wurde die humane Magen-Adenokarzinomzelllinie MKN-45 kultiviert. Außerdem wurden die Zellen der humanen Mesothelzelllinie MeT-5A und die der neonatalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) für den Assay zur Untersuchung der Wundheilung verwendet. Bei allen Zelllinien handelte es sich um adhärenz Zellen. Die verschiedenen Zellen wurden jeweils als Monolayer in 175 cm² Kulturflaschen kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde für die MKN-45 Zellen sowie für die MeT-5A Zellen das Medium RPMI 1640 + GlutaMAX-I verwendet, welches zusätzlich mit 10 % Fetalem Kälberserum (FBS), Penicillin G 100 U/ml und Streptomycin 100 µg/ml und 1 % Amphotericin B, einem Antimykotikum, angereichert wurde. Für die Fibroblasten diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + GlutaMAX-I (4,5 g/l D-glucose) als

Basisnährmedium, welches ebenfalls mit FBS, Penicillin-Streptomycin und dem Antimykotikum versetzt wurde. Alle genannten Zellkultur-Lösungen wurden von dem Unternehmen Gibco/Life Technologies GmbH aus Darmstadt in Deutschland bezogen.

2.3.2.1 Kultivierung von Zellen

Zum Aussäen wurde die in Kryoröhrchen tiefgefrorene Zelllinie aus einem -160 °C Stickstoff-Gefrierbehälter (Dampfphase) verwendet. In eine Zellkulturflasche wurde entsprechendes Kulturmedium pipettiert und das Gefäß im Inkubator erwärmt. Nach dem Auftauen der Kryoröhrchen im Schüttelwasserbad bei 37 °C wurde die nun flüssige Zellsuspension aus dem Röhrchen mit einer serologischen Pipette in das warme Medium übertragen. Dort konnten die Zellen während der Inkubation adhären und über die nächsten Tage proliferieren.

Die Inkubation der Zellkulturflaschen erfolgte im HERAccl VIOS 160i Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Aufgrund der hohen Proliferationsrate der Tumorzellen und Mesothelzellen fand ein Mediumwechsel alle ein bis zwei Tage statt. Das Medium der Fibroblasten wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Zudem wurde das Wachstum der Zellen regelmäßig unter einem Leica Lichtmikroskop DMIL kontrolliert und gegebenenfalls per Fotodokumentation mit einer Leica Lichtmikroskop Kamera über die Software Leica Application Suite festgehalten.

2.3.2.2 Passagieren

Zur Vermehrung der Zellen auf die für die Experimente benötigte Zellzahl wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 90 % bis 100 % in neue Kulturflaschen mit einer größeren Fläche passagiert. Dafür wurde das alte Nährmedium aus der Flasche mit einer serologischen Pipette abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen durch horizontales Schwenken der Flasche unter Zugabe von 25 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS-Puffer) zweimal gewaschen. Nach jeder einzelnen Zellreinigung wurde das PBS wieder verworfen. Danach wurden 5 ml einer 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung in die Kulturflasche gegeben und die Zellen für circa 10 Minuten inkubiert. In dieser Zeit sollte das Trypsin die Verbindung der adhären Zellen enzymatisch vom Flaschenuntergrund lösen. Nach entsprechender Einwirkzeit waren somit die

Zellen bei der Kontrolle unter dem Leica Lichtmikroskop schwimmend in der Trypsin-Lösung erkennbar. Durch vorsichtiges Klopfen konnten noch eventuell adhärenente Zellen vom Flaschenboden gelöst werden. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde im nächsten Schritt neues Medium zum Inhalt der Kulturflaschen zur Verdünnung hinzugefügt und durch Mischpipettieren eine Zellsuspension hergestellt. Diese Suspension wurde auf neue Kulturgefäße gleichmäßig aufgeteilt. Die neuen Kulturgefäße wurden bereits vor Beginn des Passagierens vorbereitet, mit frischem Nährmedium gefüllt und in den Inkubator zur Erwärmung gestellt. Die alten Kulturflaschen wurden nach der Passage lichtmikroskopisch auf Zellrückstände überprüft. In den frisch befüllten Gefäßen trieben nun die passagierten Zellen im entsprechenden Nährmedium. Nach ein paar Stunden Inkubationszeit adhärten bereits erste Zellen an dem neuen Flaschenboden.

Alle vorbereiteten Zellkulturmedien, Trypsin sowie PBS, wurden im Kühlschrank bei +4 °C gelagert. Das Antimykotikum, die Antibiotika und FBS wurden als Aliquots im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt. Unmittelbar vor der Anwendung wurden die Lösungen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Zellkultur-Experimente fanden durchgehend unter sterilen Bedingungen statt.

2.3.3 Experimentelle Gruppen

Folgende Gruppen wurden für die Experimente gewählt:

1. Valproinsäure
2. Paclitaxel
3. Valproinsäure in Kombination mit Paclitaxel
4. Kontrollgruppe (0,9 % NaCl)

Eine geeignete Konzentration für jedes Medikament wurde zuerst experimentell bestimmt, indem die zytotoxische Wirkung verschiedener aufsteigender Konzentrationen auf MKN-45 Zellen getestet wurde (siehe Kapitel 2.3.5). Die verwendeten Konzentrationsreihen für eine PIPAC-Anwendung wurden auf der Grundlage von Literaturdaten ausgewählt. Die PTX-Konzentrationen wurden anhand der für eine PIPAC-Phase-I-Studie vorgeschlagenen Dosis von 15 mg/m² aus einer PIPAC-Studie am Schweinmodell (Tan et al., 2021) und der

durchschnittlichen Körperoberfläche abgeleitet. Die Konzentrationen von VPA basierten auf den Ergebnissen einer in vitro Studie ($IC_{50} = 7 \text{ mM}$) an humanen Magenkarzinomzellen in Anlehnung an eine systemische Chemotherapie (Jahani et al., 2021).

Bei klinischen PIPAC-Verfahren für Doxorubicin/Cisplatin (Dosis-Behandlungsplan der Universitätsklinik Tübingen) werden standardisierte Volumen von insgesamt 200 ml (50 ml Doxorubicin-/ 150 ml Cisplatin-NaCl-Lösung) verwendet. Aus technischen Gründen wurde für dieses in vitro Experiment das Volumen der versprühten Medikamentenlösung auf 50 ml reduziert, wobei die Konzentration identisch blieb.

2.3.4 Medikamentengabe mittels PIPAC

Zur Medikamentenbehandlung wurden die Zellen (4×10^5 Zellen/ml) auf 24-well-Platten für circa zwei Tage bis zu einer Konfluenz von 60 % kultiviert. Vor der Anwendung der PIPAC wurde das gesamte verbrauchte Kulturmedium aus den einzelnen Vertiefungen der Zellkulturplatte abgesaugt. Die 24-well-Platte wurde anschließend auf den Boden einer Kunststoffbox positioniert und mit dem Deckel luftdicht verschlossen.

Verschiedene sterile Lösungen wurden mit der gewünschten Konzentration an VPA, PTX oder deren Kombination mit einem Volumen von 50 ml mit 0,9 % NaCl homogen, in erwärmten sterilen Bechern angesetzt. Dazu wurde ein steriler Magnetstab in jeden Becher platziert und die Medikamentenlösung mit einem Magnetrührer vermischt. Die Kontrolllösung bestand aus 50 ml sterilem 0,9 % NaCl. Die Lösungen wurden nacheinander mit der PIPAC-Methode auf die Zellen versprüht. Dafür wurde eine sterile Injektionsspritze mit einer der therapeutischen Lösungen gefüllt und in den Hochdruck-Angioinjektor Accutron HP-D eingesetzt (siehe Abbildung 5). An die Injektionsspritze wurde eine sterile Hochdruckleitung angebracht, die mit einem laparoskopischen Vernebler (CapnoPen®) verbunden war. Der Vernebler wurde über einen 12 mmHg Doppel-Ballon-Trokar in den Deckel der Kunststoffbox eingesetzt und fixiert.

Entsprechend des PIPAC-Verfahrens fand die Medikamentengabe unter Druck und aerosolisiert statt. Alle nötigen Parameter wurden vorab am Accutron-Display

einggegeben. Für die Applikation des Therapeutikums wurde ein Druck bis maximal 20 bar und eine Flussrate von 0,6 ml/s, wie beim klinischen PIPAC-Prozedere, gewählt. Die therapeutische Lösung wurde bei Raumtemperatur durch den Schlauch geleitet und über den CapnoPen in die Box auf die Zellen in der 24-well-Platte versprüht. Anschließend wurden die behandelten Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Steady State gehalten.

Der Versuch wurde in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt (Maxisafe 2020 1.8), welche für die Arbeit mit Zytostatika zertifiziert ist. Zur eigenen Sicherheit wurde der Versprühprozess ferngesteuert und von einem abgeschirmten Raum aus gestartet und beobachtet. Für eine möglichst kliniknahe Durchführung wurde das Verfahren mit der gleichen technischen Ausstattung durchgeführt, die am Patienten angewandt wird.

Nach Ablauf einer halben Stunde Einwirkungszeit auf die Zellen, wurde die überschüssige, toxische Flüssigkeit, die sich infolge der Verneblung in der Box angesammelt hatte, unter der Sicherheitshaube abgesaugt. Auch die Zellkulturplatte wurde gründlich gereinigt, um eine Kontamination durch das Therapeutikum zu vermeiden. Auf eine Säuberung der Zellen mit PBS-Puffer wurde verzichtet, da nach einer klinischen PIPAC-Anwendung keine Spülung mit einer Dialyseflüssigkeit zur Reinigung der Patientenbauchhöhle vorgenommen wird. So wurde die Mikrotiterplatte direkt mit 2 ml frischem RPMI-Medium befüllt und in den Inkubator gestellt.

Vor und nach der Verwendung einer Medikamentenlösung wurden alle Gerätschaften gründlich gereinigt und alle Einmalartikel ausgetauscht oder entsorgt. Es wurde außerdem bei der Arbeit mit Zytostatika permanent entsprechende Schutzkleidung getragen, um einen sicheren Umgang zu gewährleisten.

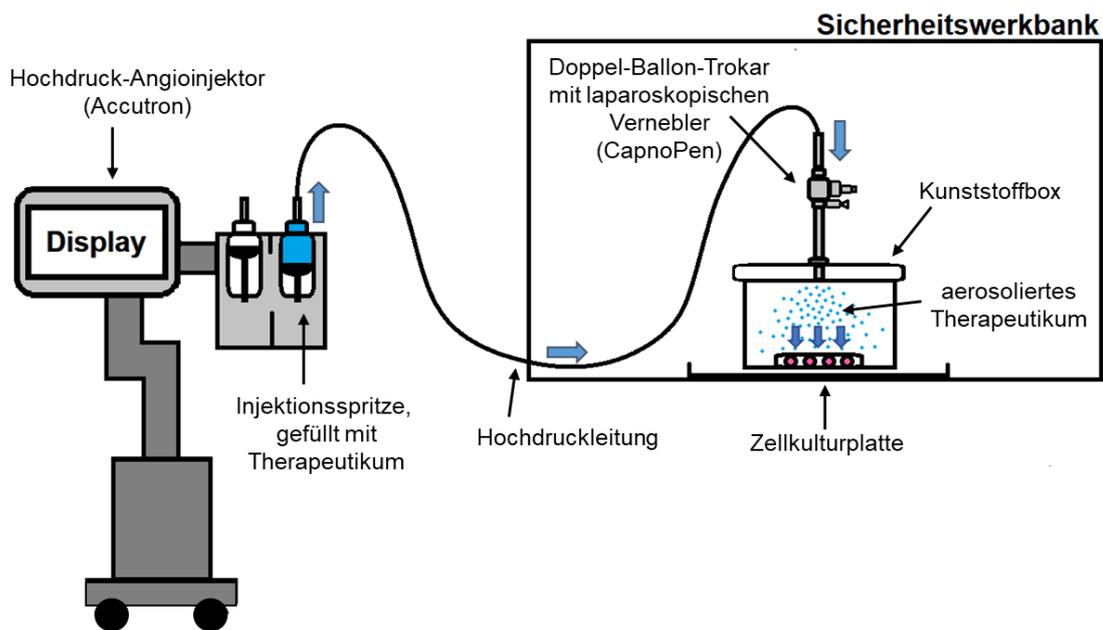


Abbildung 5: Schematische Darstellung: PIPAC-Aufbau in vitro.

Über einen Injektor wird das Therapeutikum als Aerosol unter Druck mittels CapnoPen in eine Kunststoffbox (unter einer Sicherheitswerkbank) vernebelt und wirkt auf die Zellen in der Kulturplatte für 30 min.

2.3.5 Zytotoxizitätsassay

Zuerst wurden geeignete Konzentrationen von VPA, PTX und deren Kombination unter der Anwendung einer PIPAC bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen wurden für die Durchführung der nachfolgenden Experimente im Rahmen dieser Studie weiterverwendet.

Zur Ermittlung der Konzentrationen wurde die zytotoxische Wirkung verschiedener aufsteigender Konzentrationsreihen der Therapeutika auf Magenkarzinomzellen gemessen. Als Kontrolle wurde eine Kulturplatte mit MKN-45 Zellen genutzt, die mit 0,9 % NaCl behandelt wurde. Die Zytotoxizitätswirkung der geeigneten Konzentration eines jeden Medikaments sollte einen zytotoxischen Effekt zwischen 25 % und 75 % im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe aufzeigen. Die Konzentrationen wurden vorab auf Basis von Literaturdaten, wie bereits beschrieben (siehe 2.3.3 Experimentelle Gruppen), ausgewählt. Das Experiment fand über sieben Tage statt, wobei alle ein bis zwei Tage ein Mediumswechsel mit neuem RPMI vorgenommen wurde.

Zur Vorbereitung auf den Zytotoxizitätsassay wurden MKN-45 Zellen (4×10^5 Zellen/ml) auf mehrere 24-well-Platten ausgesät und für zwei Tage inkubiert. Am Tag 0 wurde die Zellanzahl einer Kulturplatte mit unbehandelten Magenkarzinomzellen zur Bestimmung der Startkonzentration der Zellen ermittelt. Außerdem wurden ausgewählte aufsteigende Konzentrationen von VPA (126, 252 und 506 $\mu\text{g/ml}$, 1,01; 1,5; 2,02; 2,5; und 8 mg/ml), PTX (3, 10, 20, 72, 132, 264, und 528 $\mu\text{g/ml}$) und für die Kontrollgruppe 0,9 % NaCl (50 ml) über PIPAC auf die MKN-45 Zellen versprüht (siehe 2.3.4 Medikamentengabe mittels PIPAC). Basierend auf den vorher beschriebenen Literaturdaten stellte die eigentliche Ausgangskonzentration für VPA dabei 1,01 mg/ml dar (Jahani et al., 2021) und für PTX die Konzentration von 528 $\mu\text{g/ml}$ (Tan et al., 2021). Im Verlaufe des Versuchs wurde zudem die Zytotoxizität von VPA (1,01 mg/ml und 1,5 mg/ml) kombiniert mit PTX (3 $\mu\text{g/ml}$) auf MKN-45 Zellen getestet.

2.3.5.1 CASY-Zellzählung

Nach Tag 0 wurden an Tag 2, 4 und 7 weitere Messungen der Zellanzahl mit dem automatischen Zellzählgerät und Analysator CASY Model TT durchgeführt. Das Gerät berechnet automatisch für jede Probe im CASYcup einen Mittelwert aus drei Analysen. Wenn die Zellen einer Probe das elektrische Spannungsfeld in der Kapillare des CASY-Gerätes passieren, wird mit der sogenannten Pulsflächenanalyse die Unversehrtheit einer Zellmembran über ausgelöste Widerstandssignale gemessen, wodurch Rückschlüsse auf die Zellkerngröße und darüber auf die Vitalität dieser Zelle gezogen werden können. Durch den automatischen Vergleich der Messwerte kann so zwischen lebenden und toten Zellen sowie Zelltrümmern unterschieden werden, die durch verschiedene Abschnitte auf einem Graph (siehe Abbildung 6) über die Software CASYworX dargestellt werden. Für die Auszählung der MKN-45 Zellen wurden folgende Parameter im CASY eingestellt: Kapillare: 150 μm , Zyklen: 3, Probenvolumen: 400 μl , Verdünnung: 1:100, Evaluationscursor: 10,50 μm – 40 μm , Normalisierungscursor: 7,30 μm – 40 μm . Die vom CASY berechneten Werte der unbehandelten MKN-45 Zellen entsprachen 100 %. Davon ausgehend wurden die Werte der Medikamenten-Testgruppen gemittelt und in Prozent umgerechnet.

Die Standardabweichung wurde aus den jeweiligen drei Versuchsreihen bestimmt.

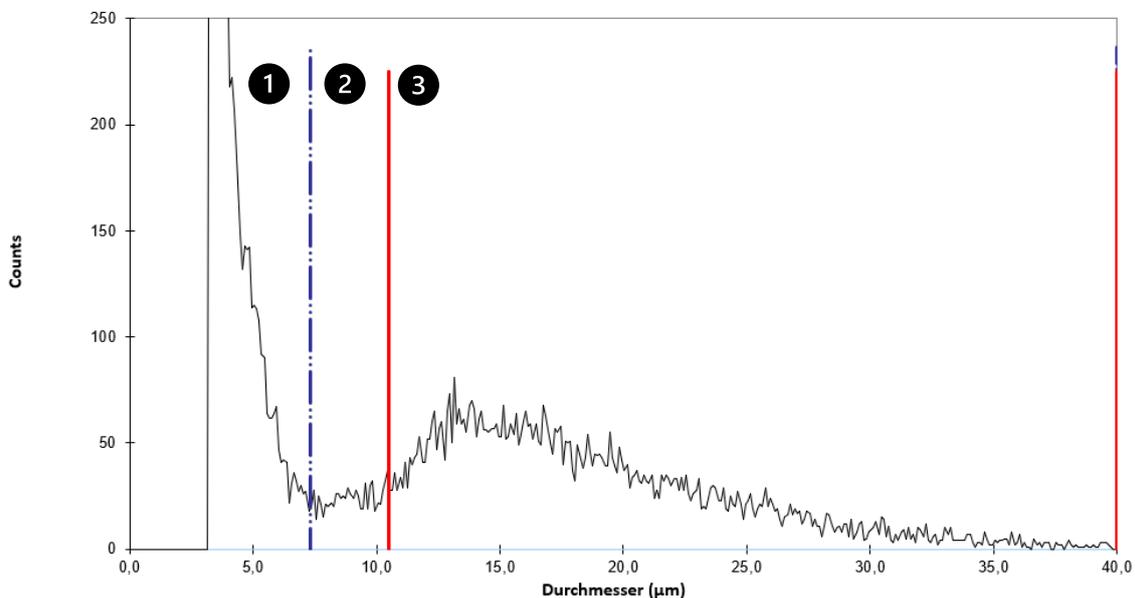


Abbildung 6: Messergebnisse einer CASY-Zellzählung.
Zählung (Counts) von MKN-45 Zellen einer Kontrollgruppe.
1: Zelltrümmer, 2: tote Zellen, 3: lebende Zellen

Für die Zellzählung wurden alle Analysen an den Untersuchungstagen an mindestens drei unterschiedlichen Proben je Versuchsgruppe erhoben. Zur Vorbereitung der Analysen wurde das alte Kulturmedium aus den einzelnen Vertiefungen mit einer gläsernen Pasteurpipette über eine Mini-Membran-Vakuumpumpe abgesaugt. In den entsprechenden Vertiefungen wurde 1 ml PBS zur Zellwaschung gegeben und anschließend wieder entfernt. Pro well wurden 250 µl Trypsin auf die Zellen pipettiert. Nach einer 10-minütigen Einwirkzeit im Inkubator wurde zu der Trypsin-Zellsuspension 750 µl neues RPMI-Medium hinzugegeben. Von der entstandenen Suspension wurden 1 ml in ein Eppendorf Safe-Lock Röhrchen überführt. Bis zum Zählen der Zellen wurden die Eppendorfgefäße in einem Überkopf-Rotationsgerät in Bewegung gehalten. In einem CASYcup wurden zuerst 5 ml CASYton, dann 100 µl von der zu testenden Suspension und abermals 5 ml CASYton vermischt. In dieser 1:100 Verdünnung konnte nun die Zellzahl ermittelt werden.

2.3.6 MTT-Assay

Die zelluläre Stoffwechselaktivität von MKN-45 Zellen als Indikator für die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit dem kolorimetrischen MTT-Assay TACS MTT Cell Proliferation Assay von R&D Systems analysiert. Während des Versuchs wandeln aktive Zellen das zugesetzte gelbe wasserlösliche MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) in violette, unlösliches Formazan um. So kann anschließend die optische Dichte (OD) der Verfärbung bestimmt werden. Der TACS Assay beinhaltet neben dem MTT Reagenz (MTT Reagent) auch eine Detergent Reagent Lösung, die der Auflösung der Formazankristalle dient.

Der MTT-Test wurde 0, 24 und 48 Stunden nach der Medikamentenbehandlung der Zellen durchgeführt und in dreifacher Ausführung wiederholt. Dabei wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt. Im Folgenden wird der Ablauf des MTT-Assays beispielhaft an einer Zellkulturplatte erläutert. Es wurde eine Zellsuspension von MKN-45 Zellen ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) hergestellt. Die Suspension wurde in ein Reagenz-Reservoir gefüllt und die Zellen gleichmäßig mit einer Mehrkanalpipette in alle Vertiefungen einer 96-well-Platte mit flachem Boden ausgesät. Dafür wurde pro well 200 µl der Zellsuspension pipettiert. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde das Nährmedium vorsichtig bis auf 50 µl pro Vertiefung entfernt, ohne dabei den Zellrasen zu zerstören. Dieses restliche Medium wurde in den wells belassen, um während der Medikamentenbehandlung eine Austrocknung der Zellen zu verhindern. Die Auswahl der Konzentrationen von VPA, PTX und der Kombination wurde anhand der Ergebnisse des vorab durchgeführten Zytotoxizitätsassay getroffen. Auf die MKN-45 Zellen wurden die vorbereiteten PIPAC-Lösungen, eine 0,9 % NaCl-Lösung als Kontrolle, verschiedene VPA-Konzentrationen (252 und 506 µg/ml, 1,01; 1,5; 2,02 und 2,5 mg/ml), PTX (3 µg/ml) und PTX in Kombination mit VPA (506 µg/ml und 1,01; 1,5; 2,02 mg/ml), pipettiert. Nach 30 Minuten Einwirkzeit, entsprechend einer PIPAC, wurde die überschüssige Lösung entfernt. Dann wurden 50 µl neues RPMI-Medium in jede Vertiefung der Platte pipettiert. Nach Herstellerangaben wurden 10 µl MTT-Reagenz pro well hinzugefügt. Anschließend wurde die Kulturplatte 4 Stunden lang inkubiert, bis der violette

Farbstoff sichtbar wurde. In jede Plattenvertiefung wurden 100 µl Detergent Reagent zugegeben, um die Formazankristalle aufzulösen. Die Mikrotiterplatte wurde danach über Nacht in eine lichtdichte Box platziert und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Absorption mit dem ELISA-Gerät NanoQuant Infinite M200 Pro Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 570 nm gemessen. Die PBS-Lösungen dienten als Blindwerte für die Absorptionsmessungen. Die Messungen wurden mit der Software Magellan ausgewertet. Dabei wurden pro Medikamentenkonzentration mehr als drei Proben berücksichtigt. Der MTT-Assay wurde nach diesem Vorgehen zum einen über zwei Tage und zum anderen über fünf Tage mit entsprechender Anzahl an Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei jede Platte einem Tag zugeordnet wurde. Die MKN-45 Zellen aller Kulturplatten bekamen am Tag 0 die PIPAC-Medikamentenlösungen appliziert. An einer Kulturplatte am Tag 0 wurde sofort der MTT-Assay begonnen. Alle anderen Mikrotiterplatten wurden je nach zugeordnetem Testtag für weitere Stunden bis hin zu mehreren Tagen inkubiert (1-5 Tage), sodass die einzelnen MTT-Messungen der jeweiligen Kulturplatte nacheinander zum entsprechenden Zeitpunkt stattfanden. Während des Experiments wurde das Kulturmedium jeden zweiten Tag gewechselt. Bei allen einzelnen Schritten wurden die Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Zur Auswertung der ELISA-Daten wurden der jeweilige Mittelwert der berechneten OD-Werte („difference data“ minus „blanc Mittelwert“) erhoben und die Standardabweichung ermittelt.

2.3.7 Migrationsassay

Die Zellmigration wurde mithilfe eines Wundheilungstests, auch Scratch-Assay genannt, bestimmt. Dabei kann die Wanderung von Zellen nach einer zugefügten mechanischen Verletzung des Zellrasens beobachtet werden. Dieses Modell simuliert die Reaktionen der Zellen im menschlichen Körper beim Versuch, eine Lücke zu schließen.

MKN-45 Zellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden in einer 24-well-Platte ausgesät und inkubiert. Bei einer Konfluenz von 90 % bis 100 % wurden mittig in jede Plattenvertiefung vertikale Wunden durch Anritzen (Scratch) der Monolayer-

Zelloberfläche erzeugt. Dafür wurde eine sterile 10 µl-Pipettenspitze verwendet. Durch das Scratching abgelöste MKN-45 Zellen wurden durch sorgfältiges Waschen mit PBS entfernt. Lösungen von VPA (252, 506 µg/ml und 1,01; 1,5; 2,02; 2,5 mg/ml), PTX (3 µg/ml), deren Kombination (PTX 3 µg/ml und VPA 506 µg/ml und 1,01; 1,5; 2,02 mg/ml) und 0,9 % NaCl (Kontrollgruppe) wurden zu den Zellen pipettiert. Die Konzentrationen wurden auch hier, entsprechend den Resultaten des vorab durchgeführten Zytotoxizitätsassays, ausgewählt. Die MKN-45 Zellen wurden 30 Minuten lang, gemäß einer PIPAC, mit den verschiedenen Lösungen behandelt. Dann wurde die verbliebene Flüssigkeit aus den wells entfernt und jeweils 2 ml RPMI-Kulturmedium hinzugefügt. Um die Migration der Zellen während des Versuchs in Echtzeit beobachten zu können, wurde das Inkubator-Mikroskop zenCell owl verwendet. Die Software zenCell owl wurde für drei Tage programmiert. Das Intervall der Bildaufnahme betrug 10 Minuten. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten bei 10facher Vergrößerung. Der Abstand der Zellränder beim erzeugten Scratch wurde mit der Software ImageJ zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Der Prozentsatz des Lückenschlusses wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 Stunden) bestimmt und die Standardabweichung ermittelt. Die Größe eines Scratches einer Probe nach 72 Stunden entsprach 100 % der durchschnittlichen Lückenbreite der jeweiligen Probe. Für die Auswertung der experimentellen Gruppen der Scratch-Assays wurden mindestens drei Proben einkalkuliert.

2.3.8 Wundheilungsassay

Die Fähigkeit von Zellen, Wunden wieder zu verschließen und zu heilen, wurde unter der Einwirkung von VPA, PTX sowie deren Kombination ebenfalls mit dem Scratch-Assay untersucht.

Allerdings wurden hierfür nicht Magenkarzinomzellen, sondern die neonatalen humane Fibroblasten (NHDF) und humane Mesothelzellen (MeT-5A) kultiviert. Die NHDF und MeT-5A Zellen wurden jeweils auf eine 24-well-Platte ausgesät (1×10^6 Zellen/ml) und inkubiert. Ungefähr 24 Stunden später hatten die Zellen eine Konfluenz von 90 bis 100 % erreicht.

Das Kulturmedium wurde dann aus den wells entfernt. Anschließend wurde jedem Zellrasen eines wells eine mechanische Wunde zugefügt, indem die Oberfläche des Monolayers in einer vertikalen Linie unterbrochen wurde. Hierfür wurde eine sterile 10 µl-Pipettenspitze verwendet. Lose Zellen wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Danach wurden verschiedene Medikamentenkonzentrationen (PTX 3 µg/ml, VPA 252, 506 µg/ml und 1,01; 1,5; 2,02 mg/ml) und 0,9 % NaCl als Kontrolle auf die Zellen pipettiert, die anschließend 30 Minuten lang entsprechend dem PIPAC-Verfahren wirkten. Die Wahl der Konzentrationen für die Versuchsgruppen basierte auf den vorherigen Experimenten. Nach Entfernung der Restlösungen wurde neues Nährmedium in die Plattenvertiefungen gegeben, und die Kulturplatte wurde drei Tage lang bei 37 °C in das Inkubator-Mikroskop zenCell owl gestellt. Das Schließen der mechanischen Wunde wurde regelmäßig in 10-Minuten-Intervallen mittels Multiplex-Echtzeit-Mikrokinematographie, bei 10facher Vergrößerung, über die Software zenCell owl aufgezeichnet. Vergleiche und Auswertungen der Bildaufnahmen erfolgten über die Software ImageJ, wie beim Migrationsassay (siehe oben). Der Wundheilungsversuch wurde mindestens dreimal durchgeführt.

2.3.9 Adhäsionsassay

Prozesse wie Zellinvasion, Migration oder Wundheilung sind ohne eine Zelladhäsion, eine Verankerung von Zellen über Adhäsionsmoleküle an Komponenten der extrazellulären Matrix, unmöglich. Der Verbund beeinflusst beispielsweise die Beweglichkeit, Proliferation und das Überleben von Zellen. Folglich ist die Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit von Krebszellen von großer Bedeutung.

Für dieses Experiment wurde ein kommerzieller kolorimetrischer Adhäsionstest CytoSelect 48-well verwendet. Damit wurde die Adhäsion der MKN-45 Tumorzellen auf verschiedenen biologischen Matrices aus den extrazellulären Matrixproteinen (ECM) Fibrinogen und Fibronectin, Kollagen I und IV sowie Laminin I gemessen; BSA diente hierbei als Negativkontrolle. Das Kit beinhaltetete

neben der beschichteten Kulturplatte eine Zellfärbelösung (Cell Stain Solution) und eine Extraktionslösung (Extraction Solution).

Zuerst wurden MKN-45 Zellen in Kulturflaschen gezüchtet.

Gemäß den Anweisungen des Herstellers wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 1 bis $1,5 \times 10^6$ MKN-45 Zellen/ml hergestellt und davon je 10 ml in vier Zentrifugenröhrchen (50 ml Tubes) gefüllt. Die Tubes wurden gleichmäßig in der Eppendorf Zentrifuge Model 5810 R positioniert und für 6 Minuten bei 24 °C und 1200 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtiger Entfernung des Zellüberstandes wurden je 10 ml spezifischer Medikamentenlösungen (VPA 1,01 mg/ml, PTX 3 µg/ml, die Kombination aus 1,01 mg/ml VPA und 3 µg/ml PTX), die anhand vorheriger Experimente bestimmt worden waren, und 0,9 % NaCl als Kontrollgruppe in die Zentrifugenröhrchen zu den MKN-45 Zellen gegeben. Die Tubes wurden in einen Überkopf-Schüttler (Röhrchen-Rotator) eingespannt. So wurden die Zellen unter regelmäßiger und langsamer Umdrehung für 30 Minuten in der Suspension gehalten, entsprechend dem Steady State einer PIPAC. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand aus Medikamentenlösung entnommen. Vorab wurde bereits neues RPMI-Medium mit Zusatz von 0,5 % FBS (anstatt 10 % FBS) hergestellt, von welchem nun 10 ml in jedes Tube eingefügt und mit den Zellen vermischt wurde. Die neuen Suspensionen mit den unterschiedlich behandelten MKN-45 Zellen wurden auf ein mit ECM-Protein beschichtetes Substrat in 48-well-Platten pipettiert (150 µl/well) und 4 Stunden lang inkubiert. Dann wurden je 100 µl Medium aus den Vertiefungen entfernt und 50 µl Restmedium gegen eine mögliche Zellaustrocknung belassen. Ungebundene MKN-45 Zellen wurden mehrmals mit 250 µl PBS aus den wells gewaschen. Nach jedem Waschgang wurde die Mikrotiterplatte unter dem Lichtmikroskop auf die nötigen Zellrückstände überprüft. Die adhärennten Zellen wurden mit 200 µl Zellfärbelösung (Cell Stain Solution) angefärbt sowie fixiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Pro well wurden wieder 200 µl der Lösung entfernt. Nach wiederholtem Waschen mit 500 µl entionisiertem Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE) und ständiger lichtmikroskopischer Zellenkontrolle wurde das gesamte Wasser aus der Mikrotiterplatte entnommen. Die Kulturplatte trocknete danach bei

Raumtemperatur an der Luft. Von einer Extraktionslösung (Extraktion Solution) wurde in jede Vertiefung 200 µl gegeben und die Platte für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einen Orbitalschüttler PSU-10i gestellt. Als nächstes wurden die einzelnen Proben der 48-well-Platte in eine 96-well-Mikrotiterplatte mit flachem Boden transferiert (150 µl/well). Die adhärenen MKN-45 Zellen wurden mit dem NanoQuant Infinite M200 Pro Mikrotiterplatten-Lesegerät ausgelesen. Die Absorption (optische Dichte) wurde bei 570 nm bestimmt. Der relative Adhäsionseffekt wurde für jede Gruppe als Mittelwert in Prozent berechnet. Die Kontrollgruppe mit NaCl entsprach dabei 100 %. Zudem wurden die Standardabweichung und Signifikanz ermittelt. Es wurden mindestens drei Proben für jede Versuchsgruppe mit dem Adhäsionsassay analysiert.

2.3.10 Statistische Auswertung

Die Auswertung und graphische Darstellung der experimentell erhobenen Ergebnisse wurden über Microsoft Excel getätigt. Die Signifikanz der Resultate des CASY-Assays und des MTT-Assays wurden als p-Werte mit Hilfe des GraphPad Prism 9-Programms (ANOVA) ermittelt. Die angegebenen p-Werte des Adhäsionsassays wurden ebenfalls mittels GraphPad Prism (Kruskal-Wallis Test) berechnet. Die Analyse und Vergleiche der zenCell owl-Bildaufnahmen des Migrations- und Wundheilungsassays erfolgten zunächst über die Software ImageJ und die Datenauswertung anschließend mit Microsoft Excel.

3 Ergebnisse

In dieser *in vitro* Studie wurden die Auswirkungen des HDACi's VPA und des Zytostatikums PTX auf bestimmte Tumormerkmale unter der Verwendung der humanen Magenkarzinomzelllinie MKN-45 erforscht. Mehrere Krebsmerkmale, darunter Tumorpheriferation, Stoffwechsel, Adhäsion und Migration, wurden beleuchtet. Für das Experiment zur Untersuchung einer medikamentösen Beeinflussung der Wundheilung wurden humane Fibroblasten (NHDF) und Mesothelzellen (MeT-5A) verwendet. Des Weiteren sollte im Rahmen der Versuche eine synergistische Wirkung von VPA in Kombination mit PTX nachgewiesen werden.

Die Anwendung der therapeutischen Lösungen erfolgte unter experimentellen PIPAC-Bedingungen.

3.1 Dosisfindung und Zytotoxizität

Zunächst sollte für diese Studie die optimale Medikamentenkonzentration sowohl für alleiniges VPA als auch für PTX ermittelt werden. Denn bei einer zu niedrigen Dosis könnte keine antitumorale Wirkung beobachtet werden, was den gesetzten Zielvorstellungen nicht entgegenkäme. Doch bei einer zu hohen Dosis würden alle MKN-45 Zellen in kürzester Zeit zu Grunde gehen, was nicht nur jeden funktionellen Versuch, sondern auch die Bewertung einer potenziellen Synergie zwischen VPA und PTX unmöglich machen würde. Es wurde also eine Konzentration benötigt, die in dem Bereich zwischen diesen zwei Extremen lag und die es ausfindig zu machen galt, auch im Hinblick auf die Durchführung der anstehenden Studienexperimente.

3.1.1 Zytotoxischer Effekt von VPA

Über sieben Tage hinweg wurde die Anzahl der vitalen MKN-45 Zellen nach der Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von VPA gemessen, um so die optimale VPA-Konzentration experimentell herauszufinden. Die Analyse der Zellproliferation erfolgte mit dem CASY-Zellzählgerät. Auf die Magenkarzinomzellen wirkte zum einen eine 0,9%ige NaCl-Lösung, die als Kontrolle verwendet wurde und zum anderen wurde der HDACi VPA in folgenden

Konzentrationen auf die MKN-45 Zellen versprüht: 126, 252 und 506 µg/ml sowie 1,01; 2,02 und 2,5 mg/ml VPA.

Grundsätzlich wurde eine zytotoxische Wirkung von VPA auf MKN-45 Zellen an Tag 2 bis Tag 7 im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet, wie in Abbildung 7 dargestellt. Dennoch schien die VPA-Wirkung der hier getesteten Konzentrationen begrenzt zu sein, da die Zellproliferation der VPA-Testgruppen sich während der sieben Tage fortsetzte. Je nach Konzentrationslevel konnte eine unterschiedliche Intensität im Verlaufe der Proliferation ausgemacht werden. Dies bedeutet, umso niedriger die angewandte Konzentration, umso geringer die Wirkung und umgekehrt.

Innerhalb der ersten 48 Stunden vermehrten sich die MKN-45 Zellen der VPA-Gruppen (ca. > 180 % Zellwachstum) im ähnlichen Maße oder stärker als die der Kontrollgruppe. Alle Messungen an Tag 4 zeigten trotz der VPA-Behandlung keinen Rückgang, sondern ein anhaltendes Wachstum der MKN-45 Zellen. Auffällig war, dass die Proliferation der MKN-45 Zellen der verschiedenen Konzentrationsgruppen alle nahe beieinander, in einem Bereich von circa 260 % bis 320 %, lagen. Allerdings übertrafen die Werte vitaler MKN-45 Zellen nicht die der NaCl-Kontrolle, was dennoch auf eine gewisse Tendenz zur Wachstumshemmung hinweist.

An Tag 7 wurde zwar eine noch geringere Differenz zwischen den Zellproliferationswerten bei der Analyse der VPA-Gruppen registriert (ca. 275-300 % Zellwachstum), doch wurde zu diesem Zeitpunkt auch gleichzeitig der größte Unterschied zwischen der Kontrolle (> 430 % Zellwachstum) und den Testgruppen anhand der Prozentwerte (< 300 % Zellwachstum) deutlich, offensichtlich verursacht durch eine langsame zytotoxische Wirkung des HDACi's auf die MKN-45 Zellen. Dies könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass die VPA-Moleküle unter experimentellen PIPAC-Bedingungen nur 30 Minuten Zeit hatten, um in das Zellzytoplasma transportiert zu werden und es deshalb zu keiner direkten zytotoxischen Wirkung, dafür aber zu einer weiteren Proliferation der Zellen kam.

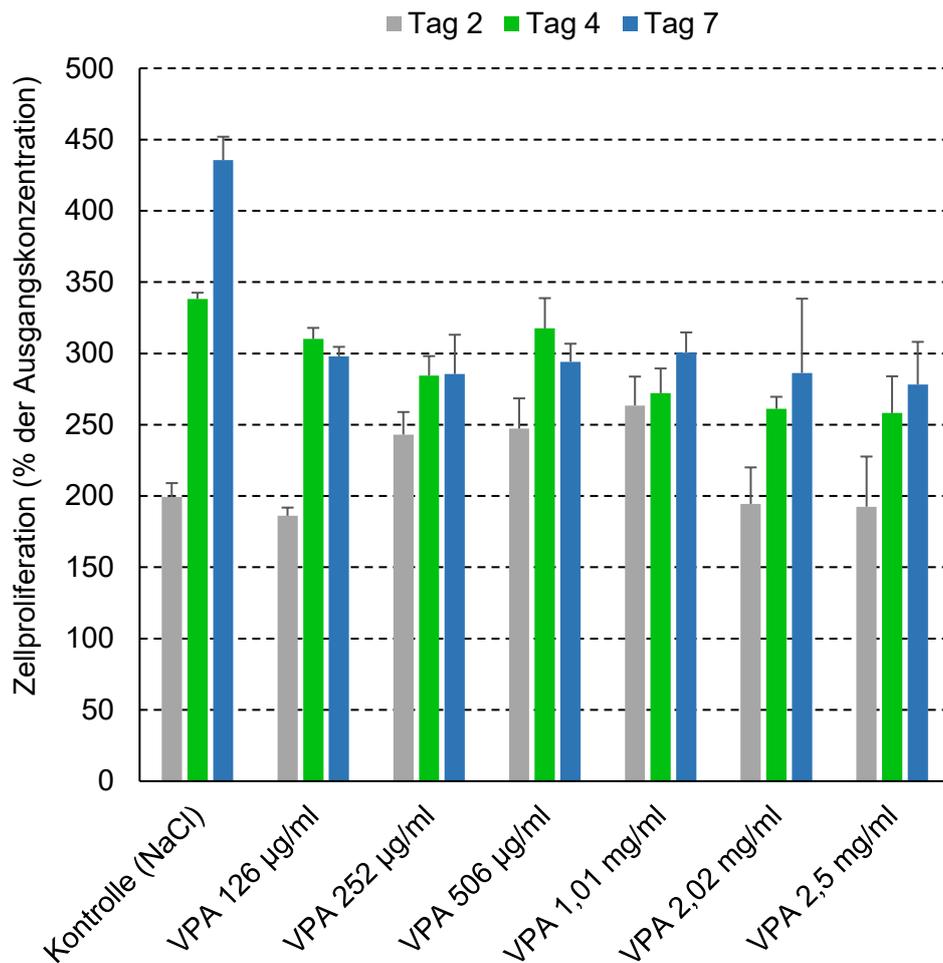


Abbildung 7: Zytotoxischer Effekt auf MKN-45 Zellen (VPA).

Versuch über 7 Tage mit einer Kontrollgruppe und VPA-Gruppen verschiedener Konzentrationen. Die Messwerte der Zellproliferation wurden als Prozente der Ausgangskonzentration (100 %) an Tag 0 angegeben.

Im Rückblick konnte festgestellt werden, dass sich ab Tag 4 bis zu Tag 7 bei allen Wirkstoffkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede mehr entwickelten. Durch die gleichbleibende Proliferation schien sich eine Stagnation eingestellt zu haben, die bis zum letzten Versuchstag anhielt.

Neben den im obigen Diagramm (Abbildung 7) dargestellten VPA-Konzentrationen wurden auch weitere, höhere Konzentrationen (> 2,5 mg/ml VPA) getestet. Im Diagramm der Abbildung 8 sind beispielhaft die Resultate des CASY-Assay mit 8 mg/ml VPA veranschaulicht.

Generell konnte bei den höheren Konzentrationen von über 2,5 mg/ml VPA kein signifikanter Unterschied zu den niedrigeren Konzentrationen oder zur

Kontrollgruppe festgestellt werden. Zwar wiesen die höheren Medikamentenkonzentrationen im Gegensatz zu niedrigeren Konzentrationen am zweiten Versuchstag eine deutlichere Abweichung von der NaCl-Kontrolle mit einer geringeren Zellproliferation auf, doch war im weiteren Verlauf wieder eine langsame Proliferation auszumachen, die je nach Konzentrationsgrad ebenfalls nach einer Woche in einer Stagnation resultierte (Vgl. Abbildung 8).

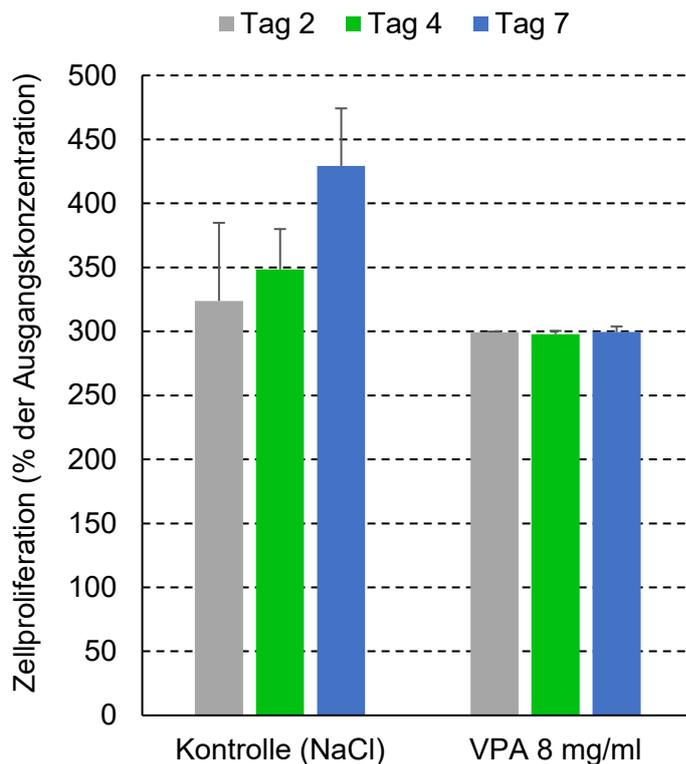


Abbildung 8: Zytotoxischer Effekt auf MKN-45 Zellen (8 mg/ml VPA).

Versuch über 7 Tage mit einer Kontrollgruppe und einer 8 mg/ml VPA-Gruppe. Die Messwerte der Zellproliferation wurden als Prozente der Ausgangskonzentration (100 %) an Tag 0 angegeben.

Da die verschiedenen niedrigen VPA-Konzentrationen während des 7 Tage andauernden Dosisfindungstests ähnliche Ergebnisse aufwiesen, wurden schließlich in den nachfolgenden Versuchen weiterhin unterschiedlich niedrige Konzentrationslevel getestet, die zur Identifikation möglicher HDACi-Effekte beitragen sollten.

3.1.2 Zytotoxischer Effekt von PTX

Um eine optimale Konzentration von PTX zu ermitteln, wurde nach einer Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen die Anzahl der lebenden Magenkrebszellen mit dem CASY-Zellzähler über sieben Tage analysiert. Die Kontrollgruppe aus MKN-45 Zellen wurde mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung behandelt. Die anderen Testgruppen wurden mit folgenden PTX-Konzentrationen besprüht: 3, 10, 20, 72, 132, 264 und 528 µg/ml PTX.

Wie in Abbildung 9 ersichtlich, zeigten die Ergebnisse des Dosisfindungsexperiments eine erwartete zytotoxische Wirkung von PTX in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration.

Im Vergleich zu der stetig gewachsenen Kontrollgruppe verursachte das Medikament bereits nach den ersten 48 Stunden einen Rückgang der Anzahl lebender Zellen. Am zweiten Tag waren alle MKN-45 Zellen, trotz unterschiedlicher Wirkstoffkonzentrationen, ähnlich stark durch PTX geschädigt, erkennbar an den Wachstumswerten zwischen 70 % und 80 %. Nach 4 Tagen wurden mit 264 µg/ml und 528 µg/ml PTX deutlichere zytotoxische Effekte auf Magenkrebszellen beobachtet als bei den niedrigeren Konzentrationen (≥ 50 % Zellwachstum). Nach einer Woche wiesen jedoch alle PTX-Gruppen weniger als 20 % vitale MKN-45 Zellen auf, insbesondere bei den höchsten Konzentrationen (264 µg/ml und 528 µg/ml). Außerdem gab es am Tag 7 den auffälligsten Unterschied in der Zellproliferation zwischen den PTX-Gruppen und der NaCl-Kontrolle (220 % Zellwachstum), wodurch die Zytotoxizität von PTX auf die MKN-45 Zellen umso offensichtlicher wurde.

Auf Grundlage der Resultate des Zytotoxizitätsassays mit PTX, der unter den gleichen Versuchsbedingungen wie das vorherige VPA-Experiment stattfand, fiel die Entscheidung auf 3 µg/ml als beste PTX-Konzentration für die nachfolgenden Studienversuche, da bereits die geringste Konzentration des Zytostatikums ähnliche Beeinträchtigungen wie die höheren Konzentrationslevel erbrachte und sonst auch kein Kombinationseffekt mit VPA sichtbar sein könnte.

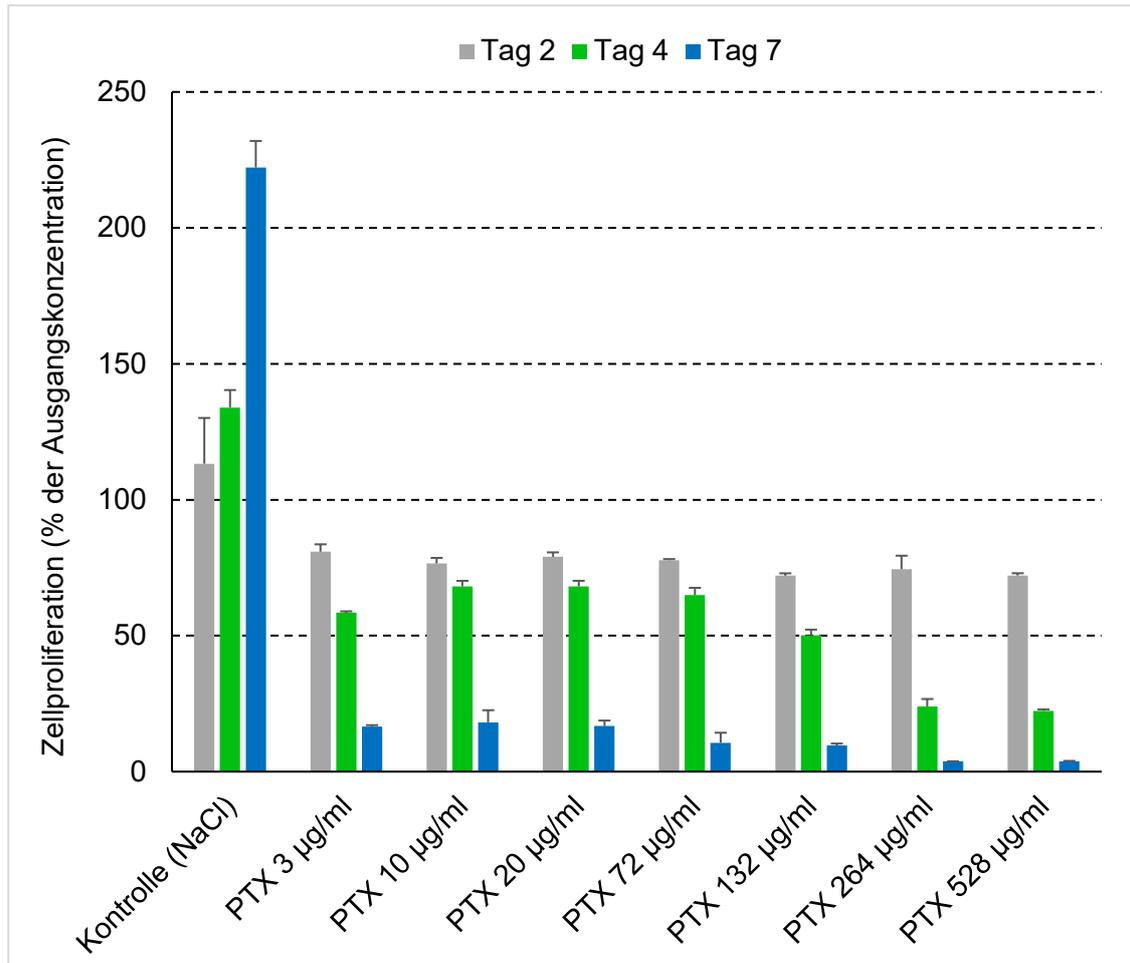


Abbildung 9: Zytotoxischer Effekt auf MKN-45 Zellen (PTX).

Versuch über 7 Tage mit einer Kontrollgruppe und PTX-Gruppen verschiedener Konzentrationen. Die Messwerte der Zellproliferation wurden als Prozente der Ausgangskonzentration (100 %) an Tag 0 angegeben.

3.1.3 Zytotoxischer Effekt von VPA mit PTX in Kombination

Auch im Rahmen dieses Teilversuchs wurde die nicht kombinierte Form von VPA und PTX der Kombination beider Therapeutika gegenübergestellt. Aufgrund der Resultate des Zytotoxizitätsassays mit PTX wurden 3 µg/ml für die Kombination gewählt. Anhand der Ergebnisse des CASY-Assays mit VPA wurden 1,01 mg/ml und 1,5 mg/ml für den Kombinationstest bestimmt.

Alleiniges PTX von 3 µg/ml zeigte, wie in Abbildung 10 ersichtlich, über den gesamten Beobachtungszeitraum eine starke zytotoxische Wirkung, die durch einen gleichmäßigen Rückgang des Zellwachstums gekennzeichnet war (Tag 7: PTX 3 µg/ml vs. NaCl: $p \leq 0,0001$). Im Gegensatz dazu initiierte der

unkombinierte HDACi bei beiden Konzentrationen (1,01 mg/ml und 1,5 mg/ml VPA) nur eine minimale Zytotoxizität bei den MKN-45 Zellen (Tag 7: VPA 1,5 mg/ml vs. NaCl: $p \leq 0,0001$). Infolgedessen war eine Veränderung der Zellproliferation im Vergleich zur PTX-Gruppe oder Kontrolle besonders erst an Tag 7 zu beobachten (Tag 7: VPA 1,5 mg/ml vs. PTX 3 μ g/ml: $p \leq 0,0001$). Dabei beschrieb nach einer Woche, nach einer Behandlung mit 1,01 mg/ml VPA, die Zellproliferation mit einem Wert von fast 230 % eine geringere Inhibition als bei 1,5 mg/ml VPA mit gerade 130 % Wachstum.

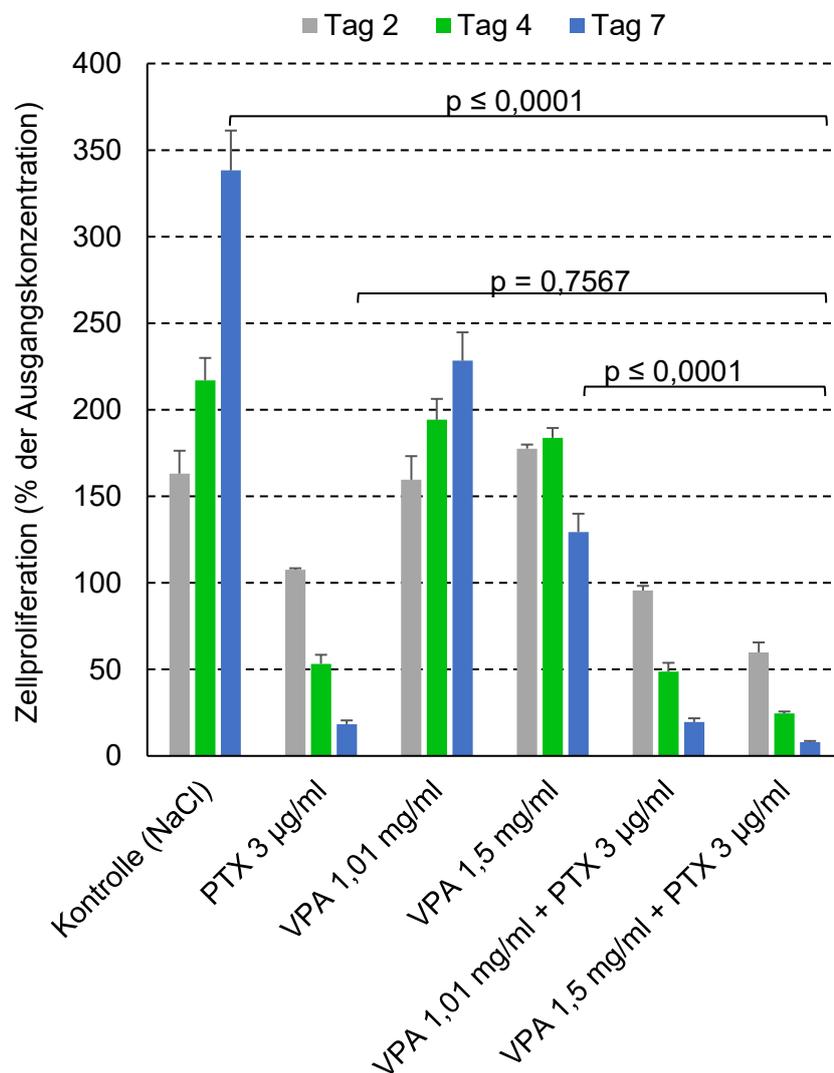


Abbildung 10: Zytotoxischer Effekt auf MKN-45 Zellen (VPA, PTX, VPA + PTX)
 Versuch über 7 Tage mit einer Kontrollgruppe, 3 μ g/ml PTX-Gruppe, VPA-Gruppen verschiedener Konzentrationen und VPA mit PTX in verschiedenen Konzentrationen. Die Messwerte der Zellproliferation wurden als Prozente der Ausgangskonzentration (100 %) an Tag 0 angegeben. Die p-Werte der jeweiligen Gruppe beziehen sich auf Tag 7.

Die Kombination beider Wirkstoffe verursachte, wie bereits die Einzelanwendung, eine Zunahme des Zellsterbens innerhalb der sieben Versuchstage. Die Medikamentenkonzentration von 1,01 mg/ml VPA in Verbindung mit 3 µg/ml PTX bewirkte bei MKN-45 Zellen eine annähernde Zytotoxizität, wie dieselbe PTX-Konzentration in alleiniger Anwendung. Dementsprechend kann hier nicht von einer Chemosensibilisierung ausgegangen werden.

VPA bei einer erhöhten Konzentration von 1,5 mg/ml in Kombination mit PTX zeigte wiederum eine stärkere Beeinträchtigung von MKN-45 Zellen gegenüber alleinigem VPA von 1,5 mg/ml und eine intensivere Wirkung als durch alleiniges PTX. Somit konnte daraus geschlossen werden, dass die Kombination von 1,5 mg/ml VPA und 3 µg/ml PTX eine Konzentrationsschwelle darstellt, ab der eine Kombination synergistisch wirkt, was auch die Signifikanz dieser Kombination unterstrich (z.B. Tag 7: VPA 1,5 mg/ml + PTX 3 µg/ml vs NaCl: $p \leq 0,0001$; VPA 1,5 mg/ml + PTX 3 µg/ml vs PTX 3 µg/ml: $p = 0,7567$; VPA 1,5 mg/ml + PTX 3 µg/ml vs VPA 1,5 mg/ml: $p \leq 0,0001$).

3.2 Metabolische Effekte

Die Stoffwechselaktivität lebender MKN-45 Zellen, die mit VPA, PTX und deren Kombination behandelt wurden, wurde durch die chemische Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) bestimmt. Die metabolische Aktivität wurde mittels Analyse der Absorptionswerte gemessen und in optische Dichte Einheiten (OD) ausgedrückt. Im Gegensatz zum vorherigen CASY-Experiment wurden die Medikamentenkonzentrationen nicht versprüht. Jedoch wirkten die Lösungen entsprechend einer PIPAC für 30 Minuten auf die Zellen ein. Grundsätzlich zeigte sich, dass die Stoffwechselaktivität der MKN-45 Zellen und folglich die Lebensfähigkeit der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe durch verschiedene Medikamentenkonzentrationen unterschiedlich intensiv beeinflusst wurde.

3.2.1 Metabolischer Effekt von VPA

Zur Untersuchung metabolischer Effekte von VPA wurden mehrere aufsteigende Konzentrationen genutzt: 252 und 506 µg/ml, 1,01; 1,5; 2,02 und 2,5 mg/ml VPA.

Wie Abbildung 11 veranschaulicht, waren die Magenkrebszellen der NaCl-Kontrollgruppe über die ersten zwei Tage zunehmend metabolisch aktiv (0,8-0,97 OD). Für die VPA-Konzentrationen von 252 µg/ml und 506 µg/ml wurden über denselben Beobachtungszeitraum ähnliche OD-Werte gemessen.

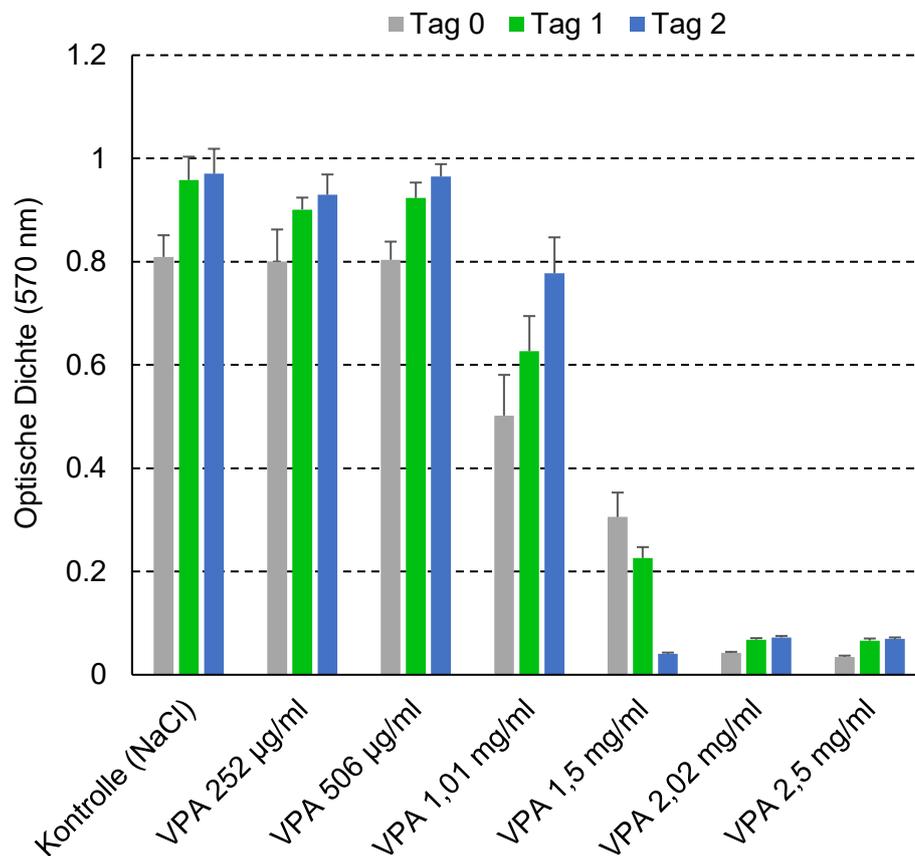


Abbildung 11: Metabolischer Effekt auf MKN-45 Zellen (VPA).

Versuch über zwei Tage mit einer Kontrollgruppe und VPA-Gruppen verschiedener Konzentrationen, gemessen mittels MTT-Assay. Die Absorption wurde bei 570 nm bestimmt.

Im Vergleich zu diesen niedrigen Konzentrationen ohne metabolische Effekte auf MKN-45 Zellen, zeigte 1,01 mg/ml VPA sofort eine inhibierende Wirkung. Am Starttag 0 war der OD-Wert von 1,01 mg/ml VPA nur etwa halb so groß (0,50 OD) wie der von 506 µg/ml VPA (0,80 OD). Während der nächsten 24 Stunden nahm die Stoffwechselaktivität der Testgruppe mit 1,01 mg/ml VPA jedoch wieder zu. Nach zwei Tagen waren die OD-Werte der VPA-Gruppe weiterhin gestiegen, dennoch aber mit 0,77 OD niedriger als die NaCl-Kontrollwerte (OD 0,96).

Die Stoffwechselaktivität der MKN-45 Zellen, die mit 1,5 mg/ml VPA behandelt wurden, war zu Beginn noch geringer (0,30 OD) als die der Gruppe mit 1,01 mg/ml VPA. Im weiteren Verlauf des Experiments nahm die metabolische Aktivität der 1,5 mg/ml VPA-Gruppe stetig ab, sodass nach 24 Stunden weniger als halb so viele Zellen (0,25 OD), verglichen mit der 1,01 mg/ml VPA-Gruppe (0,62 OD), metabolisch aktiv waren und an Tag 2 sogar nur noch eine Absorptionsdichte unter 0,1 gemessen wurde.

Eine extreme Beeinträchtigung der MKN-45 Zellen konnte anhand der Messungen direkt nach der Zellbehandlung mit 2,02 mg/ml VPA erfasst werden. Von Beginn an war die Stoffwechselaktivität im Vergleich zu der Kontroll- und PTX-Gruppe sehr limitiert (0,04 OD). In den ersten 24 Stunden stieg der Wert nur geringfügig an und blieb bis Tag 2 nahezu unverändert (0,07 OD). Bei solchen niedrigen OD-Werten kann kaum noch von einer metabolischen Aktivität gesprochen werden (Vgl. Kontrolle). Die gleichen geringen metabolischen Effekte wurden über die zwei Tage auch bei höheren VPA-Konzentrationen beobachtet (≥ 8 mg/ml VPA, Daten nicht dargestellt).

Insgesamt zeigten die Proben von 506 μ g/ml und weniger VPA keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität der MKN-45 Zellen. Ab 1,01 mg/ml VPA schien sich ein inhibierender Effekt zu manifestieren, der allerdings erst ab 1,5 mg/ml bis Tag 2 auch beständig blieb. Konzentrationen über 1,5 mg/ml VPA bewirkten sofort ab Tag 0 eine anhaltende metabolische Hemmung.

3.2.2 *Metabolischer Effekt von PTX und VPA mit PTX in Kombination*

Zur Feststellung einer potenziellen Synergie zwischen dem HDACi und PTX bezüglich der metabolischen Zellaktivität wurde, neben der NaCl-Kontrolle, sowohl eine alleinige Konzentration von VPA als auch von PTX gewählt, die zur Gegenüberstellung mit bestimmten Kombinationen dienen sollten. Für die weiteren Versuche wurden deshalb die Konzentrationen von 1,5 mg/ml VPA und 3 μ g/ml PTX ausgewählt. Gleichzeitig konnte so auch die metabolische Auswirkung von PTX auf MKN-45 Zellen analysiert werden.

Kombiniert wurde 3 μ g/ml des Chemotherapeutikums mit 506 μ g/ml, 1,01; 1,5 und 2,02 mg/ml VPA. Der Einfluss der Medikamente wurde in diesem Teilversuch

über fünf Tage beobachtet, um die Wirkung über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Die Resultate wurden in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

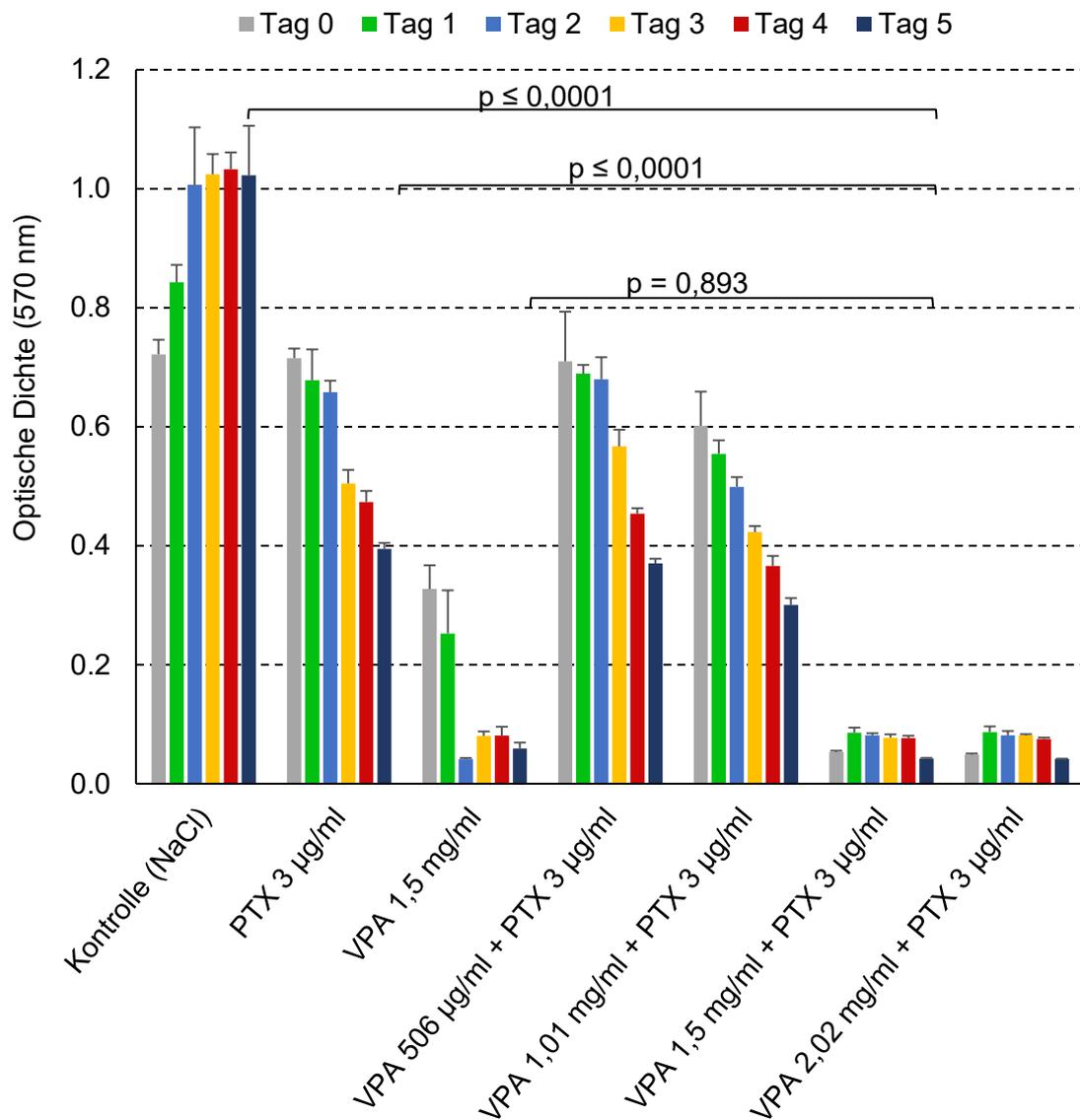


Abbildung 12: Metabolischer Effekt auf MKN-45 Zellen (VPA, PTX, VPA + PTX).

Versuch über zwei Tage mit einer Kontrollgruppe, 3 µg/ml PTX-Gruppe, 1,5 mg/ml VPA-Gruppe und VPA mit PTX in verschiedenen Konzentrationen, gemessen mittels MTT-Assay. Die Absorption (optische Dichte) wurde bei 570 nm bestimmt. Die p-Werte der jeweiligen Gruppe beziehen sich auf Tag 5.

Nach der alleinigen Behandlung mit 3 µg/ml PTX gab es innerhalb der ersten 24 Stunden, bis auf eine geringfügige Abnahme, keine nennenswerte Veränderung der metabolischen Zellaktivität (0,68 OD). Verglichen mit den gestiegenen Kontrollwerten an Tag 1 (0,84 OD) deutete sich jedoch eine metabolische

Beeinträchtigung an, was am Starttag 0 noch nicht zu erkennen war. Während der nächsten Tage verringerte sich die Stoffwechselaktivität durch PTX langsam, aber kontinuierlich, was bis zum letzten, fünften Tag anhielt (0,39 OD). Hier betrug der OD-Wert der NaCl-Kontrolle mit 1,02 mehr als das Doppelte der PTX-Gruppe (Tag 5: PTX 3 µg/ml vs. NaCl: $p \leq 0,0001$). Somit verursachte alleiniges PTX in einer Konzentration von 3 µg/ml bereits eine signifikante zytostatische Wirkung.

Unmittelbar nach der Behandlung mit 1,5 mg/ml VPA sank die metabolische Zellaktivität mit einer OD von 0,33 auf knapp die Hälfte des Wertes der Kontrollgruppe (0,72 OD) und dementsprechend auch der PTX-Gruppe. In den folgenden Tagen war eine weitere Abnahme der OD-Werte zu verzeichnen, welche sich schließlich ab Tag 2 bis Tag 5 auf einem minimalen Niveau (ca. 0,08 OD) stabilisierte (Tag 5: VPA 1,5 mg/ml vs. NaCl: $p \leq 0,0001$; VPA 1,5 mg/ml vs. PTX 3 µg/ml: $p \leq 0,0001$).

Die Analyse der Kombinationen von verschiedenen VPA-Konzentrationen mit 3 µg/ml PTX ergab folgendes: Die niedrigste VPA-Konzentration von 506 µg/ml in Verbindung mit PTX führte zu vergleichbaren Ergebnissen wie PTX in derselben, unkombinierten Konzentration angewandt. Als allerdings eine mittlere VPA-Konzentration von 1,01 mg/ml zusammen mit PTX verwendet wurde, lag die Stoffwechselaktivität an Tag 0 (0,60 OD) unter der von 3 µg/ml PTX (0,72 OD) und nahm mit der Zeit progressiv um die Hälfte (0,30 OD) ab. Auch gegenüber der unkombinierten Form von 1,01 mg/ml VPA konnte eine Veränderung erkannt werden, da diese Testgruppe nach anfänglicher Hemmung wieder eine Zunahme der metabolischen Aktivität aufwies (Abbildung 11). So könnte hier eine angehende synergistische Wirkung von 1,01 mg/ml VPA und PTX vermutet werden. Jedoch sollte die starke Wirkung von PTX bedacht werden, die den VPA-Effekt dominieren könnte.

Höhere VPA-Konzentrationen von 1,5 mg/ml und 2,02 mg/ml in Kombination mit PTX führten im Anschluss an die medikamentöse Behandlung zu einem sofortigen Rückgang der Stoffwechselaktivität der MKN-45 Zellen mit anhaltender Stagnation (bei ca. 0,08 OD), im Gegensatz zur alleinigen PTX-

Anwendung (Abbildung 12). Wie in dem Diagramm zu sehen, entsprach der geringe OD-Wert der Kombinationsgruppe 1,5 mg/ml VPA mit PTX am Starttag jedoch nicht dem Wert bei alleiniger Verabreichung von 1,5 mg/ml VPA, der zu diesem Zeitpunkt noch bei einem OD von 0,33 lag und sich erst innerhalb der nächsten 48 Stunden im ähnlichen Wertebereich wie die Kombination befand. Eine Kombination von 1,5 mg/ml VPA mit 3 µg/ml PTX verhalf also zu einer signifikant stärkeren und schnelleren metabolischen Beeinträchtigung der MKN-45 Zellen (Tag 5: VPA 1,5 mg/ml + PTX 3 µg/ml vs. NaCl: $p \leq 0,0001$; VPA 1,5 mg/ml + PTX 3 µg/ml vs. VPA 1,5 mg/ml: $p = 0,893$; VPA 1,5 mg/ml + PTX 3 µg/ml vs. PTX 3 µg/ml: $p \leq 0,001$). Im Vergleich zu 2,02 mg/ml VPA verhielt es sich mit der Kombination von PTX mit 2,02 mg/ml VPA anders. Denn hier war zwar ein Unterschied zwischen der Kombination und alleinigem PTX, allerdings keiner zur 2,02 mg/ml VPA-Gruppe, ersichtlich, wo ebenfalls an Tag 0 ein ähnlich niedriger OD-Wert gemessen wurde (Abbildung 11).

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der verschiedenen kombinierten Wirkstoffkonzentrationen, insbesondere bei der Kombination von 1,5 mg/ml VPA mit 3 µg/ml PTX, einen synergistischen Effekt auf die metabolische Aktivität der MKN-45 Zellen. Ähnliche Resultate mit geringer metabolischer Wirkung wurden bei noch höheren VPA-Konzentrationen (≥ 8 mg/ml VPA) im Zusammenspiel mit 3 µg/ml PTX beobachtet, weshalb der MTT-Test nach zwei Tagen beendet wurde (Daten nicht angegeben).

3.3 Migrationseffekte

Die Zellmigration von humanen MKN-45 Magenkrebszellen wurde mittels eines Wundheilungstests untersucht. Dafür wurden standardisierte, mechanische Wunden in den Zellrasen mit einer sterilen 10 µl-Pipettenspitze erzeugt. Die Migrationsaktivität der Zellen wurde anschließend über 72 Stunden anhand einer Kontrollgruppe (0,9 % NaCl) und drei Therapiegruppen beobachtet: alleiniges VPA in aufsteigender Konzentration (252 und 506 µg/ml, 1,01; 1,5; 2,02 mg/ml), alleiniges PTX von 3 µg/ml und Kombinationen des HDACi (506 µg/ml, 1,01; 1,5; 2,02 mg/ml VPA) mit 3 µg/ml PTX. Die experimentellen Bedingungen

entsprachen denen des MTT-Assays. Das Zellverhalten wurde in Echtzeit mikroskopisch mit einem 24-Kanal Mikroskop im Inkubator aufgezeichnet.

3.3.1 Migrationseffekt von VPA und PTX

Die Aufnahmen in Abbildung 13 dokumentieren eine kontinuierliche Bewegung und Proliferation der MKN-45 Zellen in der Kontrollgruppe (0,9 % NaCl) bis zum nahezu vollständigen Lückenschluss nach drei Tagen. Im Gegensatz dazu war die Zellmigration aller Therapiegruppen gehemmt. Trotz anfänglicher Zellmigration wurde 72 Stunden nach der PTX-Therapie mit einer Konzentration von 3 µg/ml kein Lückenschluss beobachtet, da die Bewegung nach 24 Stunden stagnierte. VPA mit einer Konzentration von 252 µg/ml oder 506 µg/ml induzierte sofort nach der medikamentösen Behandlung eine Hemmung der Migration, und die Lückenbreite im Zellrasen entsprach selbst nach 72 Stunden der Ausgangssituation. Nichtsdestotrotz war auf den Bildaufnahmen der Testgruppe mit 252 µg/ml VPA bei vereinzelt MKN-45 Zellen eine Migration im Lückenbereich zu beobachten, was vermutlich an dem niedrigeren Konzentrationslevel lag. Auf den Aufnahmen war in einigen Arealen sogar eine Auflösung des Zellrasens erkennbar. In einer von drei Proben wurde nach 48 Stunden eine Zellmigration bemerkt.

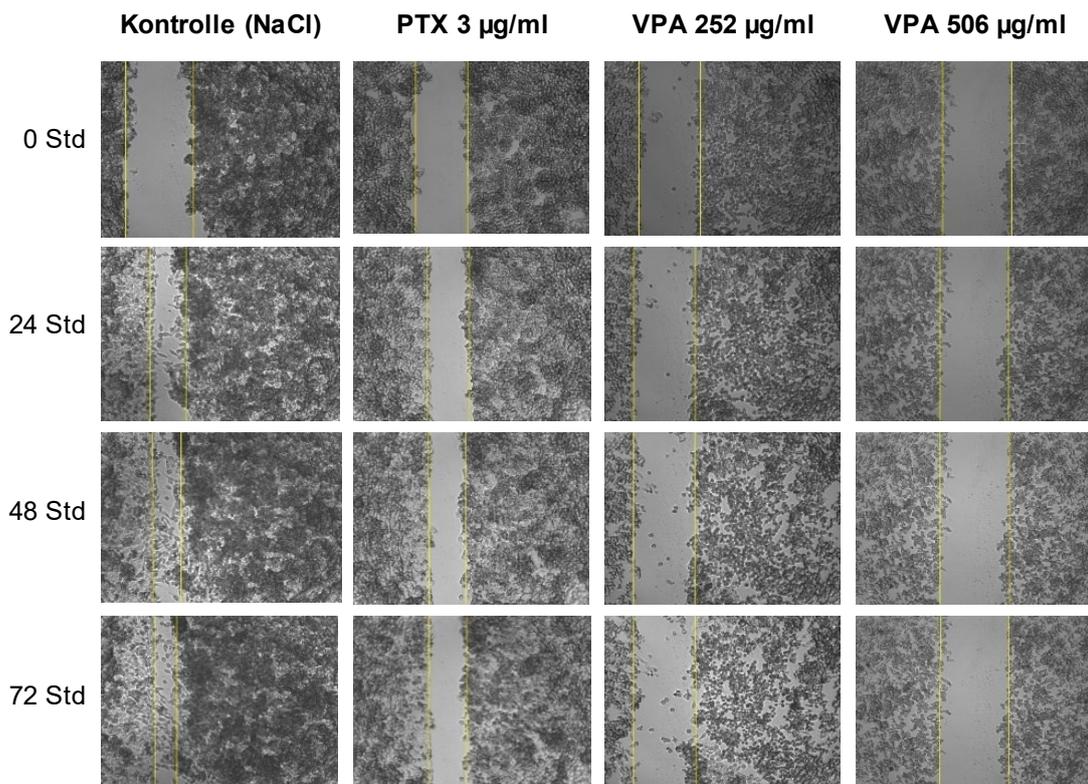


Abbildung 13: Scratch-Assay mit MKN-45 Zellen (VPA, PTX).

Versuch über 72 Stunden mit einer Kontrollgruppe, 3 µg/ml PTX-Gruppe und VPA-Gruppen verschiedener Konzentrationen mittels automatischer Echtzeit-Mikroskopie bei 10facher Vergrößerung. Gelbe Markierungen verdeutlichen den Wundbereich.

Abbildung 14 gibt den Prozess des Verschlusses der mechanischen Wunde in prozentualen Werten im Zeitverlauf (nach 72 Stunden) graphisch wieder, der nach der Verabreichung einer einzelnen Substanz (PTX oder verschiedene VPA-Konzentrationen) unterschiedlich beeinflusst wurde.

Bei einer Konzentration von 252 µg/ml beeinträchtigte VPA die Migration von MKN-45 Zellen deutlicher als PTX 3 µg/ml (Abbildung 14). Nach einer weiteren Erhöhung der VPA-Konzentration auf 506 µg/ml wurde eine dauerhafte Hemmung der Zellmigration von MKN-45 Zellen vom Anfangszeitpunkt bis zum Ende des Versuchs dokumentiert. Bis zum dritten Tag kam es zu keiner Zellbewegung und keinem Lückenschluss.

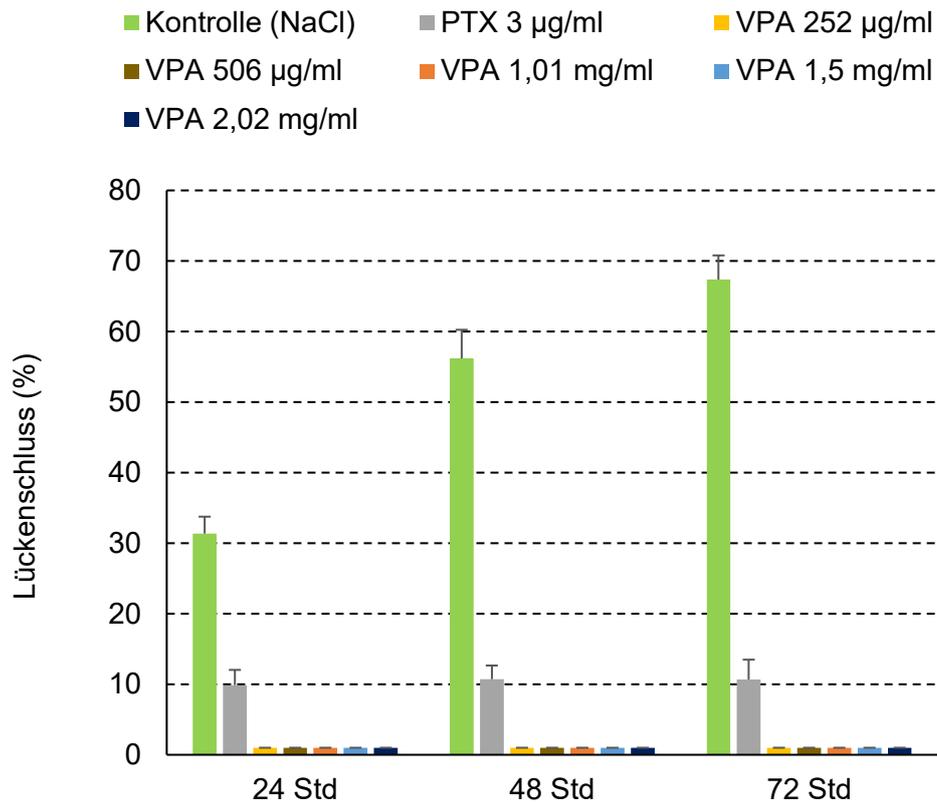


Abbildung 14: Hemmung der Migration von MKN-45 Zellen (VPA, PTX). Verschluss der mechanischen Wunde (in %), ein Lückenschluss entspricht 100 %. Versuch über 72 Stunden mit einer Kontrollgruppe, 3 µg/ml PTX-Gruppe und VPA-Gruppen verschiedener Konzentrationen.

Ähnliche Ergebnisse wurden in Versuchen mit noch höheren Konzentrationen des HDACi's entsprechend der Grafik in Abbildung 14 (1,01; 1,5; 2,02 mg/ml VPA) und den Bildaufnahmen der Abbildung 15 (1,01; 1,5; 2,02 und 2,5 mg/ml VPA) dokumentiert (Daten mit ≥ 8 mg/ml VPA nicht dargestellt).

Generell zeigten die NaCl-Kontrollen aller Migrationsassays das gleiche Ergebnis mit einem Lückenschluss nach 72 Stunden, wie auch Abbildung 14 visualisiert.

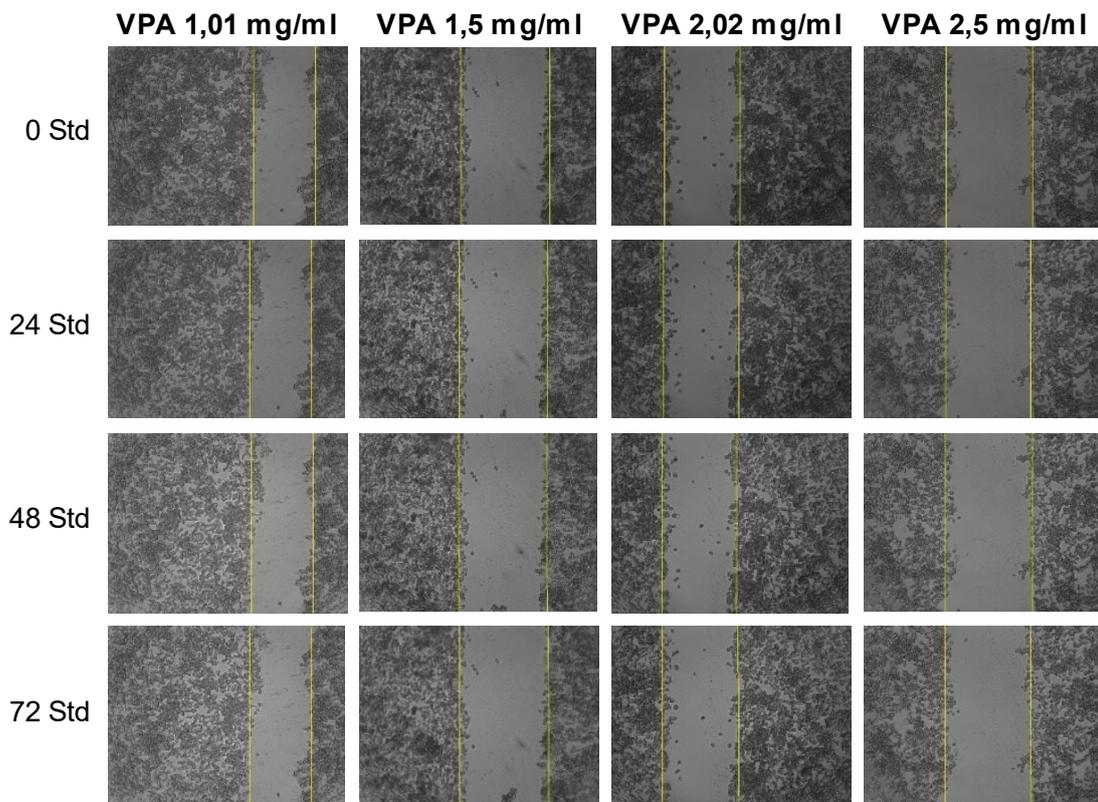


Abbildung 15: Scratch-Assay mit MKN-45 Zellen (VPA).

Versuch über 72 Stunden mit VPA-Gruppen verschiedener Konzentrationen mittels automatischer Echtzeit-Mikroskopie bei 10facher Vergrößerung. Gelbe Markierungen verdeutlichen den Wundbereich.

3.3.2 Migrationseffekt von VPA mit PTX in Kombination

Das Diagramm der Abbildung 16 veranschaulicht weitere Veränderungen beim Verschluss der mechanischen Wunde im Zeitverlauf (über 72 Std) für verschiedene Kombinationsgruppen von VPA mit PTX im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe sowie Abbildung 17 anhand mikroskopischer Aufnahmen.

Die Kombination von VPA 506 µg/ml und PTX 3 µg/ml hatte eine ebenso stark unterdrückende Wirkung auf die Migration der MKN-45 Zellen wie alleiniges VPA von 506 µg/ml (Vgl. Abbildung 13, Abbildung 14). Selbst nach 72 Stunden war weder ein Wundverschluss noch eine Zellbewegung zu verzeichnen.

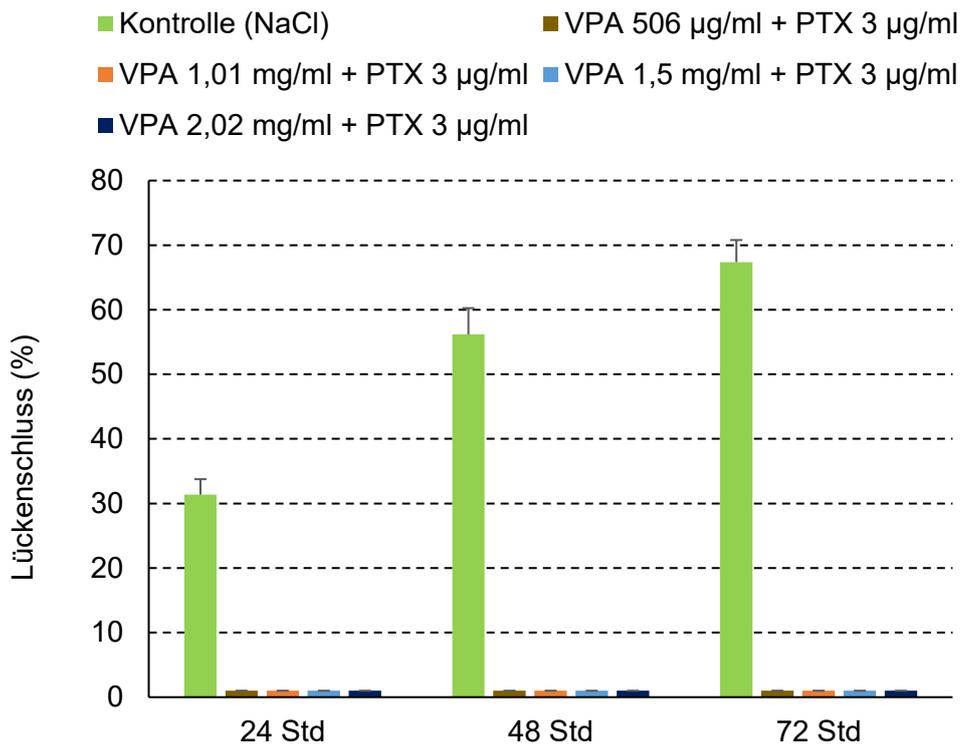


Abbildung 16: Hemmung der Migration von MKN-45 Zellen (VPA + PTX).

Verschluss der mechanischen Wunde in %, ein Lückenschluss entspricht 100 %. Versuch über 72 Stunden mit einer Kontrollgruppe und VPA mit PTX in Kombination in verschiedenen Konzentrationen.

MKN-45 Zellen mit noch höheren Konzentrationen von VPA (1,01; 1,5; 2,02 mg/ml; Daten ≥ 8 mg/ml VPA nicht gezeigt), versetzt mit 3 µg/ml PTX, wurden ebenfalls getestet (siehe Abbildung 16) und sind auch in Abbildung 17 anhand der mikroskopischen Aufnahmen nachzuvollziehen. Das Experiment mit den höheren Konzentrationen ergab die gleichen Ergebnisse wie mit niedrigeren Konzentrationen (Vgl. Abbildung 15).

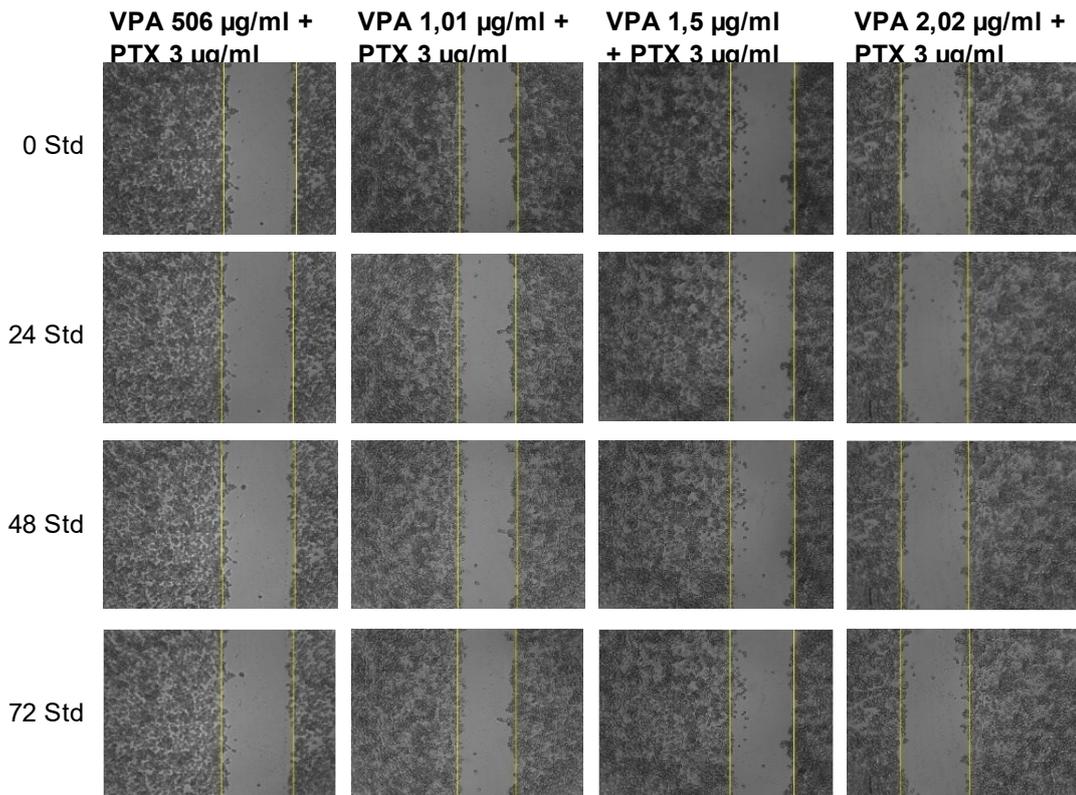


Abbildung 17: Scratch-Assay mit MKN-45 Zellen (VPA + PTX).

Versuch über 72 Stunden mit VPA und PTX in Kombination in verschiedenen Konzentrationen mittels automatischer Echtzeit-Mikroskopie bei 10facher Vergrößerung. Gelbe Markierungen verdeutlichen den Wundbereich.

3.4 Wundheilungseffekte

Die oben beschriebenen Migrationsexperimente zeigten eine zusätzliche hemmende Wirkung von VPA auf die Tumorzellen MKN-45, was die krebshemmende Wirkung des Medikaments unterstützte. Diese Experimente ließen jedoch keine Rückschlüsse auf die Wirkung von VPA bezüglich der Wundheilung zu. Zu diesem Zweck wurden weitere Scratch-Tests mit derselben Vorgehensweise wie beim Migrationsassay, allerdings mit den neonatalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) und peritonealen Mesothelzellen (MeT-5A), durchgeführt.

3.4.1 Wundheilungseffekt von VPA und PTX

Die Ergebnisse des Scratch-Assays zeigten eine sofortige hemmende Wirkung von VPA und PTX auf Fibroblasten. Ein Wundverschluss war selbst nach 72

Stunden nicht vorhanden, wie in Abbildung 18 veranschaulicht. Dagegen bedeckten die Zellen der Kontrollgruppe bereits nach 48 Stunden die komplette Oberfläche.

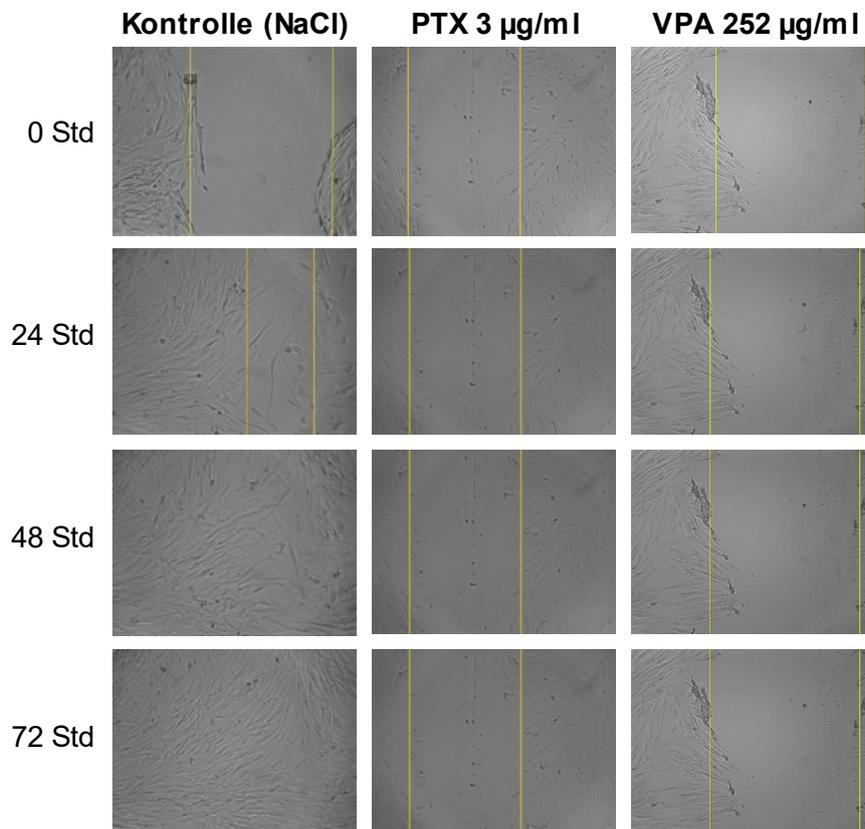


Abbildung 18: Wundheilungsassay mit NHDF Zellen (VPA, PTX).

Versuch über 72 Stunden mit einer Kontrollgruppe, 3 µg/ml PTX-Gruppe und 252 µg/ml VPA-Gruppe mittels automatischer Echtzeit-Mikroskopie bei 10facher Vergrößerung. Gelbe Markierungen verdeutlichen den Wundbereich.

Die niedrigste VPA-Konzentration von 252 µg/ml inhibierte die Migration von NHDF Zellen unverzüglich, ebenso wie alle höheren getesteten Konzentrationsstufen (506 µg/ml, 1,01, 1,5 und 2,02 mg/ml), wie in Abbildung 19 dargestellt.

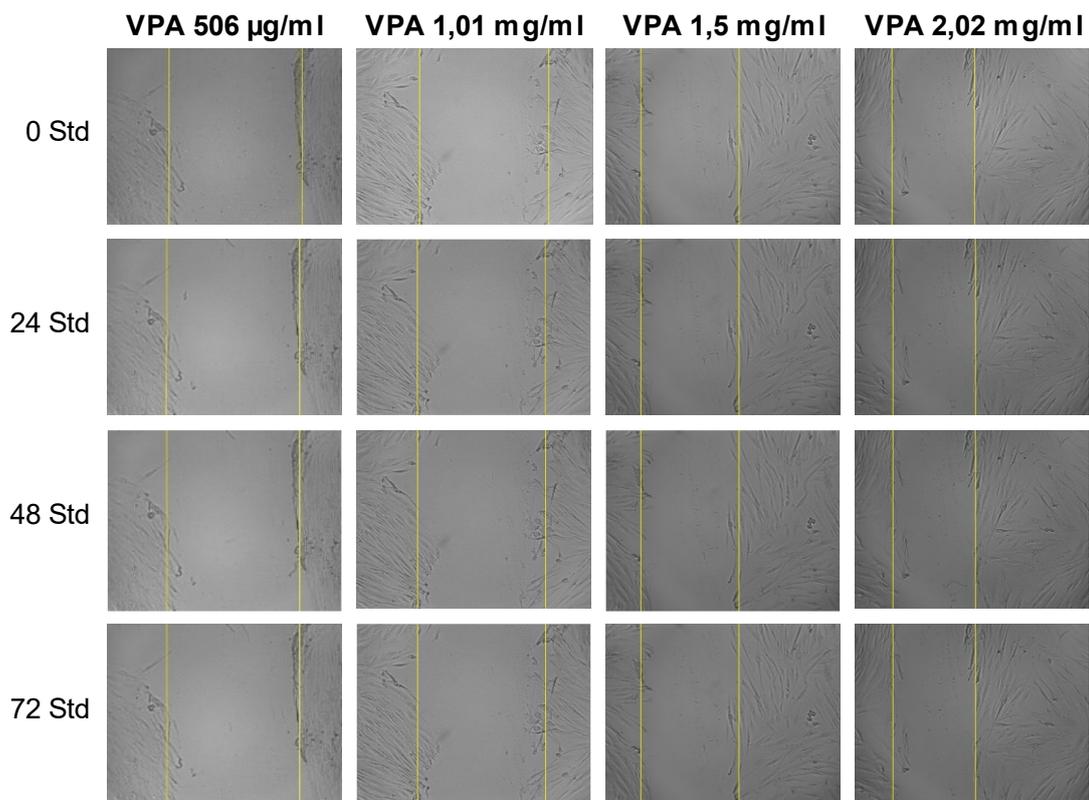


Abbildung 19: Wundheilungsassay mit NHDF Zellen (VPA).

Versuch über 72 Stunden mit VPA-Gruppen verschiedener Konzentrationen mittels automatischer Echtzeit-Mikroskopie bei 10facher Vergrößerung. Gelbe Markierungen verdeutlichen den Wundbereich.

Der Wundheilungstest mit MeT-5A Zellen wurde neben einer Kontrollgruppe mit den gleichen unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen untersucht. Diese Resultate glichen den Ergebnissen der Versuche mit NHDF Zellen.

Wie der Abbildung 20 zu entnehmen, war die Wunde der Kontrollgruppe nach 48 Stunden durch die MeT-5A Zellen geschlossen. Dagegen blieb ein Lückenschluss in den Testgruppen mit 3 µg/ml PTX und mit VPA verschiedenster Konzentrationen gänzlich aus (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21).

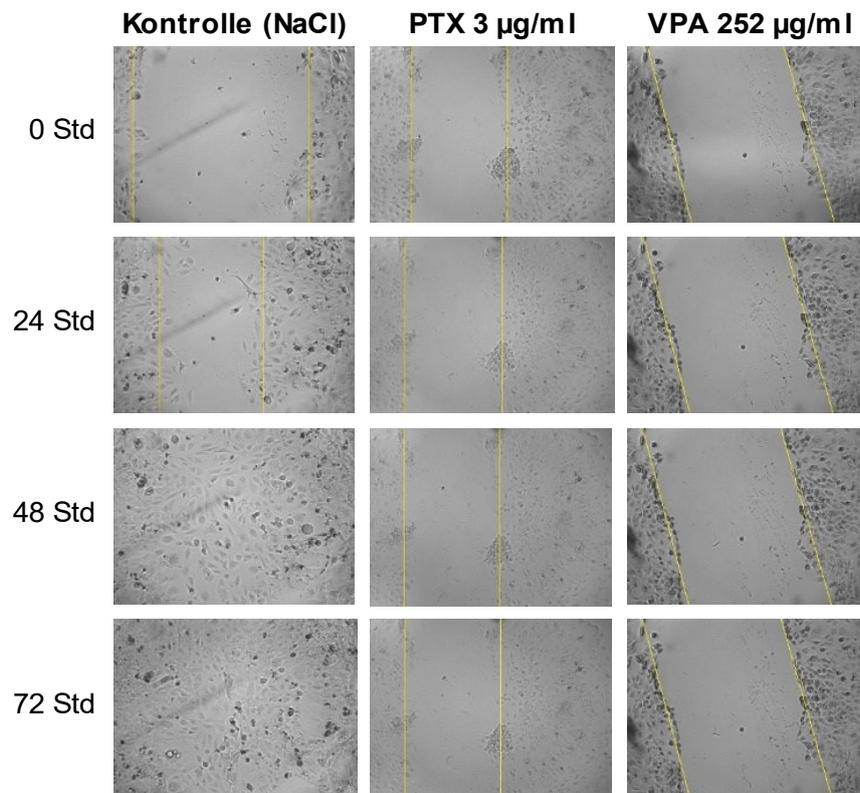


Abbildung 20: Wundheilungsassay mit MeT-5A Zellen (VPA, PTX).

Versuch über 72 Stunden mit einer Kontrollgruppe, 3 µg/ml PTX-Gruppe und 252 µg/ml VPA-Gruppe mittels automatischer Echtzeit-Mikroskopie bei 10facher Vergrößerung. Gelbe Markierungen verdeutlichen den Wundbereich.

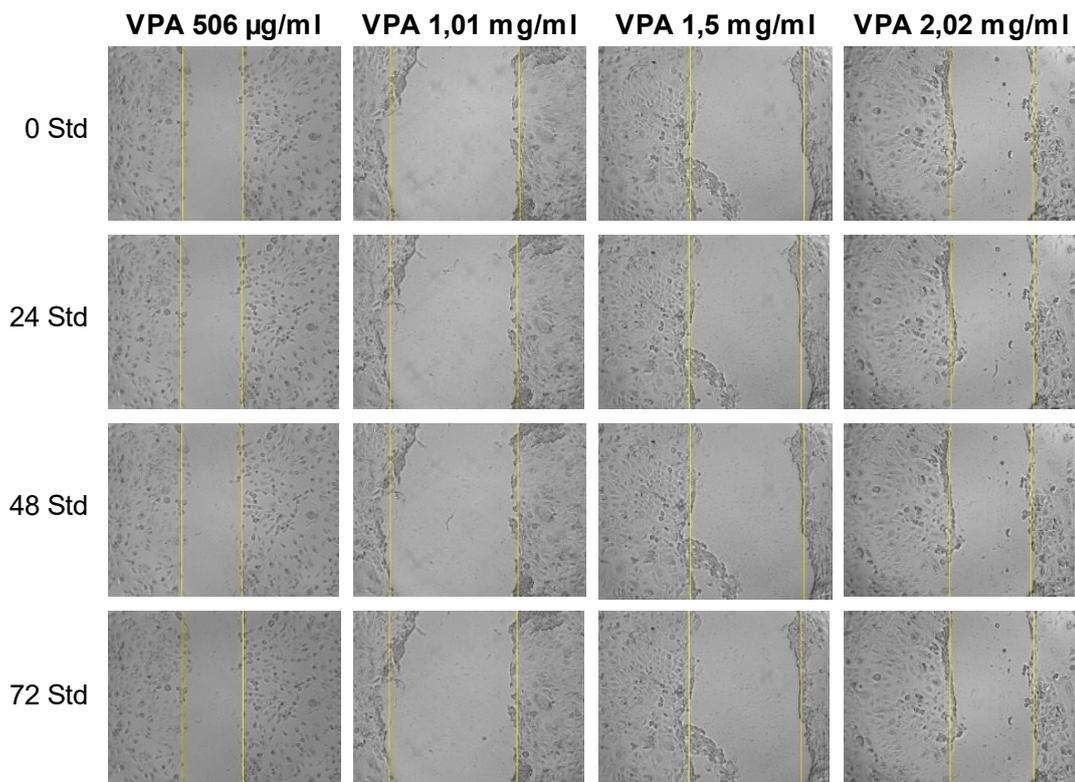


Abbildung 21: Wundheilungsassay mit MeT-5A Zellen (VPA).

Versuch über 72 Stunden mit VPA-Gruppen verschiedener Konzentrationen mittels automatischer Echtzeit-Mikroskopie bei 10facher Vergrößerung. Gelbe Markierungen verdeutlichen den Wundbereich.

Aufgrund der schnellen Hemmung sowohl von MeT-5A Zellen als auch NHDF Zellen durch die beiden Arzneimittel wurde auf eine nachfolgende Analyse der Synergie durch eine Kombination des HDACi's und des Zytostatikums verzichtet, da davon ausgegangen werden konnte, dass sich hier derselbe Effekt einstellen würde.

3.5 Adhäsionseffekte

Die Wirkung von VPA, PTX und ihrer Kombination auf die Adhäsion von MKN-45 Magenkrebszellen wurde mit einem kolorimetrischen Adhäsionstest untersucht. Gemessen wurde die Adhäsion auf den Matrices Fibrinogen und Fibronectin, Kollagen I und IV sowie Laminin I. In dem Assay wurde VPA mit einer Konzentration von 1,01 mg/ml, 3 µg/ml PTX und der Kombination von 1,01 mg/ml

VPA mit 3 µg/ml PTX gegenübergestellt, als Referenz diente die Kontrollgruppe (NaCl). Die Durchführung erfolgte ohne Aerosolisierung, aber mit 30-minütiger Einwirkzeit der Medikamentenlösung auf die Zellen.

3.5.1 Adhäsionseffekt von VPA, PTX und deren Kombination

Aus Abbildung 22 geht hervor, dass 1,01 mg/ml VPA eine starke antiadhäsive Wirkung auf alle verschiedenen Matrices ausübte (< 50 % Adhäsion), vor allem auf Kollagen I mit einer Adhäsion von nur ca. 25 % (PTX 3 µg/ml vs. VPA 1,01 mg/ml: $p = 0,05$; PTX 3 µg/ml vs. VPA + PTX: $p = 0,30$; VPA 1,01 mg/ml vs. VPA + PTX: $p \geq 0,99$) und Kollagen IV (PTX 3 µg/ml vs. VPA 1,01 mg/ml: $p = 0,03$; PTX 3 µg/ml vs. VPA + PTX: $p = 0,41$; VPA 1,01 mg/ml vs. VPA + PTX: $p = 0,89$). Im Gegensatz dazu wiesen die MKN-45 Zellen mit 3 µg/ml PTX fast überall eine nahezu uneingeschränkte Adhäsion von 100 % auf. Nur bei Fibrinogen (PTX 3 µg/ml vs. VPA 1,01 mg/ml: $p = 0,30$; PTX 3 µg/ml vs. VPA + PTX: $p = 0,89$; VPA 1,01 mg/ml vs. VPA + PTX: $p \geq 0,99$) und Laminin I (PTX 3 µg/ml vs. VPA 1,01 mg/ml: $p = 0,30$; PTX 3 µg/ml vs. VPA + PTX: $p = 0,89$; VPA 1,01 mg/ml vs. VPA + PTX: $p \geq 0,99$) zeigten die Zellen eine leichte Verringerung der Adhäsion um circa 20 %.

Ein synergistischer Effekt der Kombination von VPA mit PTX wurde allerdings nicht beobachtet, denn die Kombination bewirkte überall ähnliche antiadhäsive Effekte wie alleiniges VPA. Lediglich bei Fibronectin könnte eine Synergie angenommen werden, wobei der Unterschied zu alleinigem VPA nur sehr marginal war und unter Berücksichtigung der Standardabweichung keine Signifikanz zeigte (PTX 3 µg/ml vs. VPA 1,01 mg/ml: $p = 0,4$; PTX 3 µg/ml vs. VPA + PTX: $p = 0,03$; VPA 1,01 mg/ml vs. VPA + PTX: $p = 0,89$).

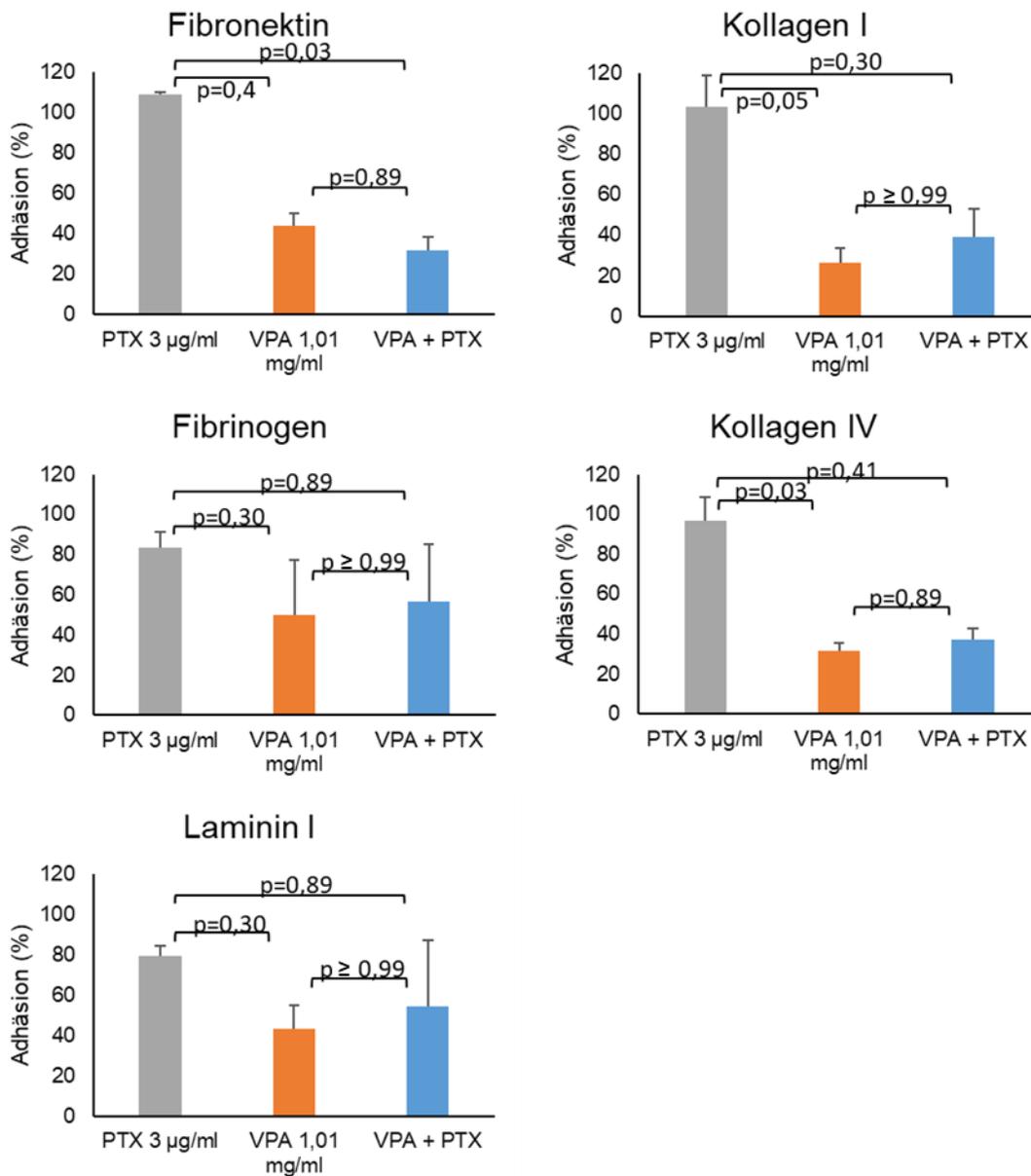


Abbildung 22: Adhäsionseffekt auf MKN-45 Zellen (VPA, PTX, VPA + PTX). Versuch nach 30-minütiger Behandlung der Zellen mit 1,01 mg/ml VPA, 3 µg/ml PTX und deren Kombination mittels Adhäsionsassay mit ECM-Beschichtung (Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen I und IV, Laminin I). Die Adhäsionsmessung der Kontrollgruppe diente als Referenz (100%).

4 Diskussion

Mit der Entdeckung, dass HDACi krebshemmend wirken, ergab sich eine neue Möglichkeit für die Therapie von Tumoren. Durch epigenetische Regulierung (Chueh et al., 2015) können HDACi Auswirkungen auf verschiedene Tumormerkmale wie Wachstum, Differenzierung oder Apoptose hervorrufen (Xu et al., 2007, Schizas et al., 2020, Eckschlager et al., 2017). In jüngster Zeit wurde eine besonders hohe Expression der HDAC-Enzyme 1 und 2, welche der Klasse I angehören, beim Magenkarzinom festgestellt (Choi et al., 2001, Song et al., 2005, Zhang et al., 2019, Yagi et al., 2010). So zeigte etwa die auch in dieser Studie verwendete Magenkarzinomzelllinie MKN-45 eine nachweisbare Überexpression von HDAC 1 Isoenzymen (Mutze et al., 2010). Studien verdeutlichten, dass VPA als HDACi vor allem die Enzymklassen I und II beeinträchtigen kann (Gurvich et al., 2004).

In Anbetracht dessen könnte VPA, das bereits als gut verträgliches Antiepileptikum bekannt ist, auch ein potenzielles Therapeutikum für die Prophylaxe und/oder Behandlung von Peritonealmetastasen beim Magenkarzinom sein. Darauf basierte die Hypothese dieser Doktorarbeit, dass der HDACi VPA das Wachstum, den Stoffwechsel, die Adhäsion und die Migration von Peritoneum-affinen Magentumorzellen wie den MKN-45 Zellen hemmen kann.

Darüber hinaus könnte ein HDACi, in Kombination mit einem herkömmlichen Chemotherapeutikum, synergistische, inhibitorische Wirkungen auf Tumore ausüben (Kim et al., 2003), was beispielsweise mit dem HDACi SAHA und Cisplatin in vitro an MKN-28 und AGS-Magenkrebszellen festgestellt werden konnte (Mutze et al., 2010). In einer anderen Studie wurde die synergistische Zytotoxizität von VPA und Cisplatin an Platin-resistenten Ovarialkarzinomzellen getestet (Lin et al., 2008). Diese Studie ließ auch darauf schließen, dass die durch die Kombination erzeugte Synergie Tumorzellen bekämpfen könnte, die resistent gegenüber der Wirkung eines Zytostatikums in alleiniger Anwendung waren. Ein ähnlicher synergetischer Effekt konnte während der in vitro Studie von

Liu et al. nach einer Behandlung von Paclitaxel-resistenten Ovarialkarzinomzellen mit PTX und SAHA beobachtet werden (Liu et al., 2014).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde daher auch die Hypothese getestet, ob eine synergistische Wirkung zwischen VPA und dem Chemotherapeutikum Paclitaxel auf Magenkarzinomzellen in vitro gegeben ist. Es gibt nur wenige Studien, die speziell am Magenkarzinom die Effekte von VPA, ob in alleiniger Anwendung oder kombiniert mit einem Zytostatikum, untersucht haben (Fushida et al., 2016). In einer Studie wurde die Wirkung von VPA und PTX auf szirrhöse Magenkarzinomzellen geprüft und anhand der Ergebnisse ein synergistischer Effekt vermutet (Yagi et al., 2010). Zum Beweis dieses synergistischen Effektes wäre allerdings eine Kontrollgruppe mit alleiniger Anwendung von PTX zum Vergleich nötig gewesen, was methodisch nicht beschrieben wurde.

Die PIPAC hat in den letzten Jahren ein großes Potenzial zur Kontrolle von Peritonealrezidiven beim Magenkarzinom gezeigt. Es gab bisher aber keine Studie über die Verabreichung von VPA bei humanen Magenkarzinomzelllinien mittels PIPAC-Technologie. Diese Studie zum Einsatz der PIPAC in dieser Indikation war daher wissenschaftlich sinnvoll.

Dass der Einsatz von Chemotherapeutika nach der Operation von Malignomen zur Verhinderung peritonealer Metastasierungen negative Auswirkungen auf die Wundheilung (van der Kolk et al., 1999, Graf et al., 1994) haben kann, ist bereits bekannt. So stellt die erhöhte Inzidenz von postoperativen Anastomosen-Leckages allerdings auch ein Nachteil der lokal angewendeten PIPAC dar (Tavernier et al., 2020). Es scheint jedoch, dass die Inhibition des HDAC-Enzyms, neben Antitumoreffekten, den Wundheilungsprozess nicht beeinträchtigt oder diesen sogar vielleicht begünstigt (Ala et al., 2020, Costalonga et al., 2017, Cassidy et al., 2014). Deshalb wurde in dieser Arbeit die weitere Hypothese geprüft, ob VPA die Wundheilung beeinflusst.

Zur Untersuchung der genannten Hypothesen wurde anhand von in vitro Experimenten die Wirkung der HDAC-Hemmung von VPA mit oder ohne PTX auf MKN-45 Zellen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (0,9 % NaCl) erforscht. Die medikamentöse Behandlung fand über Aerosolisierung oder Pipettieren statt und

wurde für 30 Minuten im Steady State, wie analog zum PIPAC-Verfahren, aufrechterhalten.

Die anfängliche Analyse der Zellzahl der lebenden MKN-45 Zellen im CASY-Assay ergab nur eine langsam wirkende und minimale zytotoxische Wirkung von VPA bei einer alleinigen Anwendung. Die verschiedenen Testgruppen geringer und höherer Konzentrationen von VPA wiesen kaum Unterschiede im Zellwachstum untereinander auf. Vergleichbare Ergebnisse konnten aufgrund fehlender Untersuchungen zur Zytotoxizität von VPA in anderen Studien nicht gefunden werden.

Im Gegensatz zum HDACi induzierte alleiniges PTX, selbst bei sehr niedrigen Konzentrationen, eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung in vitro mit einer deutlichen Verringerung des Zellwachstums. Die Untersuchung der Kombination von VPA und PTX zeigte eine synergistische Wirkung bei einer Konzentration von 3 µg/ml PTX und 1,5 mg/ml VPA. Der Kombinationsversuch belegte aber auch, dass bei einer zu geringen VPA-Konzentration die PTX-Wirkung dominierte (1,01 mg/ml VPA mit 3 µg/ml PTX). In diesem Fall gab es keinen Unterschied zwischen alleinigem PTX und der gleichen PTX-Konzentration in Verbindung mit VPA.

Die Resultate des MTT-Assays belegten, dass die metabolische Wirkung von VPA von der Medikamentenkonzentration abhängig war. Niedrige Konzentrationen ($\leq 1,01$ mg/ml VPA) verursachten entweder keine Inhibition oder zeigten, nach einer kurzen Hemmung des Stoffwechsels, eine Erholung der MKN-45 Zellen. Eine signifikante Einschränkung der metabolischen Zellaktivität wurde erst ab einer VPA-Konzentration von 1,5 mg/ml deutlich. Bei einer Konzentration von 2,02 mg/ml VPA wurde eine sofortige und intensive Stoffwechselhemmung ausgelöst. Auch in anderen Studien wurde eine Abnahme der metabolischen Aktivität durch VPA nachgewiesen (Jahani et al., 2021, Yagi et al., 2010, Zhao et al., 2011). Allerdings muss die längere Behandlungsdauer mit niedrigeren VPA-Konzentrationen in diesen Studien im Vergleich zu der sehr kurzen Einwirkzeit der PIPAC in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt werden. Ausgehend von der PIPAC-Standardbehandlung mit einem 30-minütigen Steady

State kann davon ausgegangen werden, dass höhere Konzentrationen notwendig sind als bei längeren Expositionszeiten, um signifikante Effekte zu erzielen.

In der Studie von Sun et al. wurde die hemmende Wirkung von VPA (mindestens 24-stündige Behandlung) auf die Zellviabilität mittels MTT-Assay anhand verschiedener humaner Magenkarzinomzelllinien (MKN-28, MKN-74, AGS, SGC-7901) analysiert, und sie zeigte ebenfalls eine konzentrations- und außerdem zelllinienabhängige Wirkung. Denn das Zellwachstum der AGS- und SGC-7901 Zelllinien wurde durch VPA stark gehemmt, während beispielsweise die MKN-74 Zellen gegenüber der VPA-Exposition resistent waren (Sun et al., 2020). Die Möglichkeit besteht also, dass auch die in dieser Arbeit verwendete MKN-45 Zelllinie resistenter gegenüber VPA sein könnte als andere Magenkrebszelllinien. Diese relative Resistenz könnte die träge metabolische Reaktion der MKN-45 Zellen erklären, die erst ab der Verwendung von 1,01 mg/ml VPA deutlich erkennbar war.

Alleiniges PTX mit einer Konzentration von 3 µg/ml verursachte im MTT-Assay eine progressive Abnahme der Stoffwechselaktivität. Diese hemmende Wirkung von PTX auf Magenkrebszellen bestätigt die Ergebnisse früherer Studien (Sakashita et al., 2008, Zhou und Zhu, 2003, Sun et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wirkte die Kombination von 1,5 mg/ml VPA mit 3 µg/ml PTX synergistisch auf die MKN-45 Zellen. Niedrigere VPA-Konzentrationen, in Kombination mit PTX, führten zu einer ähnlich starken metabolischen Abnahme wie 3 µg/ml PTX allein angewendet. Höhere VPA-Konzentrationen, in Verbindung mit PTX, bewirkten eine sofortige Hemmung wie die entsprechende VPA-Konzentration in alleiniger Anwendung. Yagi et al. untersuchten unter anderem die Auswirkung von VPA in Kombination mit PTX auf das Wachstum von szirrhösen Magenkrebszellen. Die Studie bestätigte eine dosisabhängige Wirkung der Medikamentenkombination. Allerdings trat diese Wirkung nach einer Behandlungszeit von mehr als 30 Minuten auf. Synergistische Effekte zwischen VPA und PTX konnten jedoch nur vermutet werden, da alleiniges PTX zum Vergleich nicht getestet wurde (Yagi et al., 2010).

Im anschließenden Scratch-Assay bewirkten alle unterschiedlichen Konzentrationen von VPA eine sofortige Hemmung der Migration von MKN-45 Zellen. Eine vergleichbare Methode mit Magenkarzinomzellen wurde in keiner anderen Studie mit dem HDACi angewandt. Doch laut Jahani et al. verringerte VPA die Migration menschlicher AGS-Magenkrebszellen während eines Boyden-Kammer-Assays (Jahani et al., 2021). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit weiteren Studien, die sich auf andere Tumorzelltypen bezogen, überein. So wurde schon eine migrationshemmende Wirkung von VPA bei Prostatakrebs (Zhang et al., 2011), Brustkrebs (Li et al., 2012, Wawruszak et al., 2019) und Nierenkrebs (Xi et al., 2018) beschrieben. Aufgrund der minimalen Zellbewegung der MKN-45 Zellen, die noch bei einer Konzentration von 252 µg/ml VPA während des Scratch-Assays bestand, kann davon ausgegangen werden, dass diese Konzentration die Inhibitionsschwelle war, und dass niedrigere Konzentrationen keinen oder einen deutlich geringeren Einfluss auf die MKN-45 Migration haben würden. Diese Annahme kann auch durch die Brustkrebsstudie von Li et al. gestützt werden, die eine langsame Zellbewegung nach einer 24-stündigen Behandlung mit niedrigen VPA-Konzentrationen zeigte (Li et al., 2012). In der Kombination von VPA mit PTX dokumentierte der Scratch-Assay zwar eine begrenzte Migration von MKN-45 Zellen, aber nach drei Tagen immer noch keinen Lückenschluss der mechanischen Wunde. Eine ähnliche beeinträchtigende Wirkung von PTX auf die Migrationsfähigkeit derselben Magenkrebszelllinie MKN-45 ergab eine weitere Studie (Matsuoka et al., 1994). PTX in Kombination mit VPA führte zu einer sofortigen Migrationshemmung der Tumorzellen im Scratch-Assay, wie VPA in alleiniger Anwendung. Zu dieser Fragestellung liegen keine publizierten Ergebnisse vor, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit mit keiner anderen Studie verglichen werden können.

Der Scratch-Assay, der in der vorliegenden Arbeit zur Beurteilung der Wundheilung an humanen NHDF Zellen und MeT-5A Zellen durchgeführt wurde, zeigte bei jeder Testgruppe noch drei Tage später einen unveränderten zellfreien Spalt. Es gibt keine vergleichbaren Studien über die Wirkung von VPA auf ein Wundheilungsexperiment. In Bezug auf PTX weisen andere Studien jedoch darauf hin, dass das Zellwachstum von Fibroblasten bereits mit einer viel

niedrigeren Konzentration gehemmt wird (Matsuoka et al., 1994). Deshalb könnte schon allein die PTX-Konzentration von 3 µg/ml für das Resultat verantwortlich sein, da der zytotoxische Effekt dem HDACi-Effekt überwiegt. So wurde auch an Tenon-Fibroblasten, nach einer einstündigen PTX-Behandlung mit weitaus geringeren Konzentrationen als in der vorliegenden Arbeit, ein langsamerer Wundverschluss beobachtet (Choritz et al., 2010). Die Studie führte zudem noch einmal die Bedeutung der Behandlungsdauer vor Augen, da bei kontinuierlicher PTX-Anwendung deutlichere Auswirkungen zu beobachten waren.

Die starke antiadhäsive Wirkung von alleinigem VPA wurde bei anderen Tumorzellen, wie Prostata- (Wedel et al., 2011) und Nierenkrebszellen (Jones et al., 2009) auf Kollagen, Laminin und Fibronectin schon nachgewiesen. Auch in dieser Arbeit hemmte VPA die Anheftung der Zellen um mindestens 50 %. Die PTX-Applizierung auf die Magenkarzinomzellen war nahezu wirkungslos im Adhäsionsassays. Die Adhäsionsfähigkeit der MKN-45 Zellen auf die unterschiedlichen ECM-Protein-Beschichtungen glich hierbei der Kontrollgruppe, und PTX hatte keinen messbaren Einfluss auf die Adhäsion von MKN-45 Zellen. Bei der Kombination von PTX mit VPA entstand kein signifikanter Unterschied zu alleinigem VPA. Allerdings hätte sich eine mögliche antiadhäsive Beeinträchtigung der kombinierten Therapie auch erst später, nach mehreren Tagen, einstellen können und so auch gegebenenfalls eine eindeutige Synergie bei Fibronectin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass VPA in dieser Studie einen konzentrationsabhängigen, inhibitorischen Effekt auf alle untersuchten Tumormerkmale hatte. Die zytotoxische Wirkung von VPA war jedoch sehr begrenzt. Wider Erwarten wirkte sich VPA negativ auf die Wundheilung von Fibroblasten und Mesothelzellen aus. PTX beeinträchtigte die Zellproliferation je nach Konzentrationslevel und hemmte bei einer Konzentration von 3 µg/ml den Stoffwechsel, die Migration und die Wundheilung, hatte aber keine Adhäsionswirkung auf MKN-45 Zellen. Es konnte festgestellt werden, dass eine synergistische zytotoxische und metabolische Wirkung nur bei einer Konzentration von 1,5 mg/ml VPA in Kombination mit 3 µg/ml PTX auftrat. Die chemosensibilisierende Wirkung hing dabei von dem untersuchten

Tumormerkmal und der Wirkstoffkonzentration ab. Die Ergebnisse dieser Arbeit passen gut in die Forschungslandschaft. So konnten beispielsweise Fushida et al. in einer randomisierten Phase-II-Studie über VPA und PTX als Zweit- oder Drittlinientherapie für fortgeschrittenen Magentumor keine synergistischen Effekte ausmachen (Fushida et al., 2016).

Allgemein sollte noch erwähnt werden, dass der hohe Konzentrationsunterschied zwischen den in dieser Studie angewandten Arzneimitteln VPA und PTX die Resultate der einzelnen Experimente dieser Arbeit schwer miteinander vergleichbar macht (z.B. liegt die Differenz von 3 µg/ml PTX und 1,5 mg/ml VPA (1500 µg/ml) bei einem Faktor von 500).

Basierend auf den Ergebnissen der Experimente dieser Arbeit könnte VPA mit der PIPAC-Technologie verabreicht werden. Jedoch widerlegen die Resultate des Scratch-Assays die Hypothese, dass VPA zur Verhinderung eines intraperitonealen Magenkarzinomrezidivs ohne Beeinträchtigung der Wundheilung beiträgt. Der starke wundheilungshemmende Effekt des HDACi's könnte auf die hohe VPA-Konzentration zurückzuführen sein. Dann hätte aber eine niedrigere Konzentration von alleinigem VPA keinen antitumoralen Einfluss auf Magenkrebszellen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die therapeutische Wirksamkeit von VPA stark von der Tumorentität abhängig war (Duenas-Gonzalez et al., 2008). So könnte VPA jedoch möglicherweise für die postoperative IP-Behandlung anderer Malignome nützlich sein, VPA hätte keine nachteiligen Wundheilungseffekte auf normale Zellen der Tumormikroumgebung und es käme zu keiner Peritonealfibrose. Diese Annahme ist jedoch spekulativ. Daher wären zusätzliche Untersuchungen über den HDAC-Hemmungsprozess bei Magenkrebs, den Einfluss von VPA auf weitere Tumoreigenschaften oder den molekularen Hintergrund notwendig.

Diese Studie hat dazu beigetragen, eine innovative Medikamentenkombination zu untersuchen, mit dem Ziel einer besseren Behandlung. Durch die unterschiedliche Beeinflussung der Tumormerkmale jedes Medikaments kann die Kombination von VPA und PTX die Wirkung des jeweils anderen ergänzen oder sogar verstärken. Die Konzentration eines Chemotherapeutikums könnte

durch Zugabe des gut verträglichen VPA verringert werden, und würde zu einer besseren Verträglichkeit des Medikaments bei den Patienten führen. Bislang gab es nur eine Studie über die Anwendung von PTX mit der PIPAC-Technologie bei Schweinen (Tan et al., 2021) und keine über die Anwendung von VPA mit PIPAC. Daher sind weitere Studien empfehlenswert, um genauere Schlussfolgerungen über die potenzielle Verwendung von VPA, PTX und deren Kombination, mit PIPAC zu ziehen.

5 Zusammenfassung

VPA ist ein Histon-Deacetylase-Inhibitor, der weitreichende Auswirkungen auf Krebsmerkmale hat und der ein mögliches Therapeutikum für die Prophylaxe von peritonealen Rezidiven beim Magenkarzinom ist. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die antitumoralen Effekte von VPA auf humane, Peritoneum-affine Magenkarzinomzellen bestimmt. Spezifisch wurde deren Zellproliferation, metabolische Aktivität, Zellmigration und Adhäsion in vitro untersucht. Darüber hinaus wurde die Vermutung, dass VPA keine negative Auswirkung auf die Wundheilung ausübt, experimentell an Fibroblasten und Mesothelzellen analysiert. Zusätzlich wurde jeder Versuch mit VPA auch in Kombination mit dem Chemotherapeutikum PTX durchgeführt, um eine mögliche synergistische Wirkung der beiden Substanzen feststellen zu können. Die Zellen wurden mittels PIPAC als Aerosol verabreicht. Als Vergleich diente eine mit 0,9 % NaCl behandelte Kontrollgruppe.

Die Zahl der lebenden MKN-45 Zellen wurde mittels CASY-Assay eine Woche gemessen, um die zytotoxische Wirkung der Medikamente zu analysieren. Die metabolische Wirkung von VPA und PTX auf vitale MKN-45 Zellen wurde mittels MTT-Assay untersucht. Zur Untersuchung der Zellmigration von MKN-45 und der Wundheilung von medikamentenbehandelten Fibroblasten und Mesothelzellen wurde ein Scratch-Assay durchgeführt. Die Adhäsion von MKN-45 Zellen wurde mittels eines Adhäsionstests auf einer ECM-Protein-beschichteten Zellkulturplatte getestet.

Der CASY-Assay ergab nur eine langsam wirkende und minimale zytotoxische Wirkung von VPA auf MKN-45 Zellen. Die verschiedenen Konzentrationsgruppen von VPA wiesen untereinander kaum Unterschiede im Zellwachstum auf. Die metabolische Wirkung von VPA hing von dem Konzentrationslevel ab. Ab einer Konzentration von 2,02 mg/ml wurde eine sofortige metabolische Hemmung induziert. Im Scratch-Assay bewirkten alle untersuchten Konzentrationen von VPA eine starke Hemmung der Migration von Magenkrebszellen. Der Wundheilungstest mit VPA behandelten NHDF Zellen und MeT-5A Zellen zeigte bei jeder getesteten Konzentration keinen Wundschluss. VPA von 1,01 mg/ml

hemmte die Zelladhäsion. Die Kombination von 1,5 mg/ml VPA und 3 µg/ml PTX zeigte eine synergistische zytotoxische sowie metabolische Wirkung der Medikamente auf MKN-45 Zellen.

Aus den Resultaten der Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass VPA mit der PIPAC-Technologie angewendet werden kann. In den vorliegenden Experimenten hatte VPA eine konzentrationsabhängige, hemmende Wirkung auf alle untersuchten Malignitätsmerkmale einer human, Peritoneum-affinen Magenkarzinomzelllinie. Die synergistische Wirkung von PTX und VPA hing von dem untersuchten Krebsmerkmal und der Wirkstoffkonzentration ab. Jedoch beeinträchtigte VPA die Wundheilung in vitro. Das Potenzial der intraperitonealen VPA-Verabreichung, allein oder in Kombination mit PTX, bei der ersten kurativen Operation scheint daher eher begrenzt zu sein, um das Auftreten eines Peritonealrezidivs beim Magenkarzinoms zu vermeiden.

6 Literaturverzeichnis

- ALA, M., MOHAMMAD JAFARI, R., NEMATIAN, H., GANJEDANESH, M. R. & DEHPOUR, A. R. 2020. Sodium Valproate Improves Skin Flap Survival via Gamma-Aminobutyric Acid and Histone Deacetylase Inhibitory System. *J Surg Res*, 246, 519-526.
- ALBANESE, A. M., ALBANESE, E. F., MIÑO, J. H., GÓMEZ, E., GÓMEZ, M., ZANDOMENI, M. & MERLO, A. B. 2009. Peritoneal surface area: measurements of 40 structures covered by peritoneum: correlation between total peritoneal surface area and the surface calculated by formulas. *Surg Radiol Anat*, 31, 369-77.
- ALYAMI, M., BONNOT, P. E., MERCIER, F., LAPLACE, N., VILLENEUVE, L., PASSOT, G., BAKRIN, N., KEPENEKIAN, V. & GLEHEN, O. 2021. Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) for unresectable peritoneal metastasis from gastric cancer. *Eur J Surg Oncol*, 47, 123-127.
- AMNEKAR, R. V., KHAN, S. A., RASHID, M., KHADE, B., THORAT, R., GERA, P., SHRIKHANDE, S. V., SMOOT, D. T., ASHKTORAB, H. & GUPTA, S. 2020. Histone deacetylase inhibitor pre-treatment enhances the efficacy of DNA-interacting chemotherapeutic drugs in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 26, 598-613.
- ARMSTRONG, D. K., BUNDY, B., WENZEL, L., HUANG, H. Q., BAERGEN, R., LELE, S., COPELAND, L. J., WALKER, J. L. & BURGER, R. A. 2006. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 354, 34-43.
- BIELIAUSKAS, A. V. & PFLUM, M. K. 2008. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Chem Soc Rev*, 37, 1402-13.
- BLACKBURN, S. C. & STANTON, M. P. 2014. Anatomy and physiology of the peritoneum. *Semin Pediatr Surg*, 23, 326-30.
- BRODIE, S. A. & BRANDES, J. C. 2014. Could valproic acid be an effective anticancer agent? The evidence so far. *Expert Rev Anticancer Ther*, 14, 1097-100.
- CASSIDY, M. R., SHERBURNE, A. C., SHELDON, H. K., GAINSBURY, M. L., HEYDRICK, S. & STUCCHI, A. F. 2014. Histone deacetylase inhibitors decrease intra-abdominal adhesions with one intraoperative dose by reducing peritoneal fibrin deposition pathways. *Surgery*, 155, 234-44.
- CHOI, J. H., KWON, H. J., YOON, B. I., KIM, J. H., HAN, S. U., JOO, H. J. & KIM, D. Y. 2001. Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res*, 92, 1300-4.
- CHORITZ, L., GRUB, J., WEGNER, M., PFEIFFER, N. & THIEME, H. 2010. Paclitaxel inhibits growth, migration and collagen production of human Tenon's fibroblasts--potential use in drug-eluting glaucoma drainage devices. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 248, 197-206.
- CHUEH, A. C., TSE, J. W., TÖGEL, L. & MARIADASON, J. M. 2015. Mechanisms of Histone Deacetylase Inhibitor-Regulated Gene Expression in Cancer Cells. *Antioxid Redox Signal*, 23, 66-84.

- COSTALONGA, E. C., DE FREITAS, L. J., ARAGONE, D., SILVA, F. M. O. & NORONHA, I. L. 2017. Anti-fibrotic effects of valproic acid in experimental peritoneal fibrosis. *PLoS One*, 12, e0184302.
- DEDRICK, R. L., MYERS, C. E., BUNGAY, P. M. & DEVITA, V. T., JR. 1978. Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer. *Cancer Treat Rep*, 62, 1-11.
- DUENAS-GONZALEZ, A., CANDELARIA, M., PEREZ-PLASCENCIA, C., PEREZ-CARDENAS, E., DE LA CRUZ-HERNANDEZ, E. & HERRERA, L. A. 2008. Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev*, 34, 206-22.
- DVORAK, H. F. 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 315, 1650-9.
- ECKSCHLAGER, T., PLCH, J., STIBOROVA, M. & HRABETA, J. 2017. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci*, 18.
- 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.
- FUSHIDA, S., KINOSHITA, J., KAJI, M., OYAMA, K., HIRONO, Y., TSUKADA, T., FUJIMURA, T. & OHTA, T. 2016. Paclitaxel plus valproic acid versus paclitaxel alone as second- or third-line therapy for advanced gastric cancer: a randomized Phase II trial. *Drug Des Devel Ther*, 10, 2353-8.
- GAO, L., CUETO, M. A., ASSELBERGS, F. & ATADJA, P. 2002. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem*, 277, 25748-55.
- GELMON, K. 1994. The taxoids: paclitaxel and docetaxel. *Lancet*, 344, 1267-72.
- GLOBOCAN. 2020. *Estimated number of incident cases and deaths worldwide, both sexes, all ages (excl. NMSC)* [Online]. International Agency for Research on Cancer. Available: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=0&include_nmssc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D [Accessed 07.04. 2022].
- GÖTTLICHER, M., MINUCCI, S., ZHU, P., KRÄMER, O. H., SCHIMPF, A., GIAVARA, S., SLEEMAN, J. P., LO COCO, F., NERVI, C., PELICCI, P. G. & HEINZEL, T. 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo j*, 20, 6969-78.

- GRAF, W., IVARSSON, M., GERDIN, B., HELLSING, K., PÅHLMAN, L. & GLIMELIUS, B. 1994. The influence of early postoperative intraperitoneal chemotherapy on human wound healing. *J Surg Res*, 57, 394-400.
- GREGORETTI, I. V., LEE, Y. M. & GOODSON, H. V. 2004. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*, 338, 17-31.
- GURVICH, N., TSYGANKOVA, O. M., MEINKOTH, J. L. & KLEIN, P. S. 2004. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res*, 64, 1079-86.
- HALKIDOU, K., GAUGHAN, L., COOK, S., LEUNG, H. Y., NEAL, D. E. & ROBSON, C. N. 2004. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*, 59, 177-89.
- HUANG, B. H., LABAN, M., LEUNG, C. H., LEE, L., LEE, C. K., SALTO-TELLEZ, M., RAJU, G. C. & HOOL, S. C. 2005. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ*, 12, 395-404.
- IKOMA, N., CHEN, H. C., WANG, X., BLUM, M., ESTRELLA, J. S., FOURNIER, K., MANSFIELD, P., AJANI, J. & BADGWELL, B. D. 2017. Patterns of Initial Recurrence in Gastric Adenocarcinoma in the Era of Preoperative Therapy. *Ann Surg Oncol*, 24, 2679-2687.
- JACQUET, P. & SUGARBAKER, P. H. 1996. Peritoneal-plasma barrier. *Cancer Treat Res*, 82, 53-63.
- JAHANI, M., KHANAHMAD, H. & NIKPOUR, P. 2021. Evaluation of the Effects of Valproic Acid Treatment on Cell Survival and Epithelial-Mesenchymal Transition-Related Features of Human Gastric Cancer Cells. *J Gastrointest Cancer*, 52, 676-681.
- JOHNO, I., BIALER, M., NICKELSON, S. A. & LEVY, R. H. 1984. Disposition of progabide and valproic acid following intraperitoneal administration in rhesus monkey. *Epilepsia*, 25, 578-85.
- JONES, J., JUENGEL, E., MICKUCKYTE, A., HUDAK, L., WEDEL, S., JONAS, D., HINTEREDER, G. & BLAHETA, R. A. 2009. Valproic acid blocks adhesion of renal cell carcinoma cells to endothelium and extracellular matrix. *J Cell Mol Med*, 13, 2342-2352.
- KATOH, H. & ISHIKAWA, S. 2021. Lifestyles, genetics, and future perspectives on gastric cancer in east Asian populations. *J Hum Genet*, 66, 887-899.
- KHAN, N., JEFFERS, M., KUMAR, S., HACKETT, C., BOLDOG, F., KHRAMTSOV, N., QIAN, X., MILLS, E., BERGHS, S. C., CAREY, N., FINN, P. W., COLLINS, L. S., TUMBER, A., RITCHIE, J. W., JENSEN, P. B., LICHENSTEIN, H. S. & SEHESTED, M. 2008. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J*, 409, 581-9.
- KIM, B. & HONG, J. 2015. An overview of naturally occurring histone deacetylase inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 14, 2759-82.
- KIM, H. H. 2021. *Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) Using Paclitaxel in Gastric Cancer Patients With Peritoneal Metastasis* [Online]. ClinicalTrials.gov. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04913662> [Accessed 07.04. 2022].

- KIM, M. S., BLAKE, M., BAEK, J. H., KOHLHAGEN, G., POMMIER, Y. & CARRIER, F. 2003. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res*, 63, 7291-300.
- KOBAYASHI, D. & KODERA, Y. 2017. Intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer with peritoneal metastasis. *Gastric Cancer*, 20, 111-121.
- LEHRMAN, G., HOGUE, I. B., PALMER, S., JENNINGS, C., SPINA, C. A., WIEGAND, A., LANDAY, A. L., COOMBS, R. W., RICHMAN, D. D., MELLORS, J. W., COFFIN, J. M., BOSCH, R. J. & MARGOLIS, D. M. 2005. Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet*, 366, 549-55.
- LI, G. F., QIAN, T. L., LI, G. S., YANG, C. X., QIN, M., HUANG, J., SUN, M. & HAN, Y. Q. 2012. Sodium valproate inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell migration by upregulating NM23H1 expression. *Genet Mol Res*, 11, 77-86.
- LIN, C. T., LAI, H. C., LEE, H. Y., LIN, W. H., CHANG, C. C., CHU, T. Y., LIN, Y. W., LEE, K. D. & YU, M. H. 2008. Valproic acid resensitizes cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Sci*, 99, 1218-26.
- LIPSKA, K., GUMIENICZEK, A. & FILIP, A. A. 2020. Anticonvulsant valproic acid and other short-chain fatty acids as novel anticancer therapeutics: Possibilities and challenges. *Acta Pharm*, 70, 291-301.
- LIU, Z., TONG, Y., LIU, Y., LIU, H., LI, C., ZHAO, Y. & ZHANG, Y. 2014. Effects of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) combined with paclitaxel (PTX) on paclitaxel-resistant ovarian cancer cells and insights into the underlying mechanisms. *Cancer Cell Int*, 14, 112.
- MATSUOKA, H., FURUSAWA, M., TOMODA, H. & SEO, Y. 1994. Difference in cytotoxicity of paclitaxel against neoplastic and normal cells. *Anticancer Res*, 14, 163-7.
- MELICHAR, B. & FREEDMAN, R. S. 2002. Immunology of the peritoneal cavity: relevance for host-tumor relation. *Int J Gynecol Cancer*, 12, 3-17.
- MILLER, K., WANG, M., GRALOW, J., DICKLER, M., COBLEIGH, M., PEREZ, E. A., SHENKIER, T., CELLA, D. & DAVIDSON, N. E. 2007. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 357, 2666-76.
- MUTZE, K., LANGER, R., BECKER, K., OTT, K., NOVOTNY, A., LUBER, B., HAPFELMEIER, A., GÖTTLICHER, M., HÖFLER, H. & KELLER, G. 2010. Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 expression and chemotherapy in gastric cancer. *Ann Surg Oncol*, 17, 3336-43.
- NADERI, N., MADANI, S. Y., MOSAHEBI, A. & SEIFALIAN, A. M. 2015. Octa-ammonium POSS-conjugated single-walled carbon nanotubes as vehicles for targeted delivery of paclitaxel. *Nano Rev*, 6, 28297.
- POCARD, M. & REYMOND, M. A. 2020. "Peritoneal failure": A new concept to explain negative results of randomized trials evaluating intraperitoneal therapies. *Pleura Peritoneum*, 5, 20200117.
- REYMOND, M. A., HU, B., GARCIA, A., RECK, T., KÖCKERLING, F., HESS, J. & MOREL, P. 2000. Feasibility of therapeutic pneumoperitoneum in a large animal model using a microvaporisator. *Surg Endosc*, 14, 51-5.

- SAKASHITA, F., OSADA, S., TAKEMURA, M., IMAI, H., TOMITA, H., NONAKA, K., TAKAHASHI, T. & SEISHIMA, M. 2008. The effect of p53 gene expression on the inhibition of cell proliferation by paclitaxel. *Cancer Chemother Pharmacol*, 62, 379-85.
- SANDLER, A., GRAY, R., PERRY, M. C., BRAHMER, J., SCHILLER, J. H., DOWLATI, A., LILENBAUM, R. & JOHNSON, D. H. 2006. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 355, 2542-50.
- SCHIZAS, D., MASTORAKI, A., NAAR, L., TSILIMIGRAS, D. I., KATSAROS, I., FRAGKIADAKI, V., KARACHALIOU, G. S., ARKADOPOULOS, N., LIAKAKOS, T. & MORIS, D. 2020. Histone Deacetylases (HDACs) in Gastric Cancer: An Update of their Emerging Prognostic and Therapeutic Role. *Curr Med Chem*, 27, 6099-6111.
- SOLASS, W., KERB, R., MÜRDTER, T., GIGER-PABST, U., STRUMBERG, D., TEMPFER, C., ZIEREN, J., SCHWAB, M. & REYMOND, M. A. 2014. Intraperitoneal chemotherapy of peritoneal carcinomatosis using pressurized aerosol as an alternative to liquid solution: first evidence for efficacy. *Ann Surg Oncol*, 21, 553-9.
- SONG, J., NOH, J. H., LEE, J. H., EUN, J. W., AHN, Y. M., KIM, S. Y., LEE, S. H., PARK, W. S., YOO, N. J., LEE, J. Y. & NAM, S. W. 2005. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *Apmis*, 113, 264-8.
- ST. PETERSBURG STATE PAVLOV MEDICAL UNIVERSITY. 2020. *Oncological Benefits of Pressured Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) in Patients With T3-4 Gastric Cancer Cyt- (GASPACCO)* [Online]. ClinicalTrials.gov. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04595929> [Accessed 07.04. 2022].
- SUGARBAKER, P. H. 2018. Gastric cancer: prevention and treatment of peritoneal metastases. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 4.
- SUGARBAKER, P. H. 2019. Prevention and Treatment of Peritoneal Metastases: a Comprehensive Review. *Indian J Surg Oncol*, 10, 3-23.
- SUGARBAKER, P. H. 2021. Intraperitoneal paclitaxel: pharmacology, clinical results and future prospects. *J Gastrointest Oncol*, 12, S231-s239.
- SUN, J., PIAO, J., LI, N., YANG, Y., KIM, K. Y. & LIN, Z. 2020. Valproic acid targets HDAC1/2 and HDAC1/PTEN/Akt signalling to inhibit cell proliferation via the induction of autophagy in gastric cancer. *Febs j*, 287, 2118-2133.
- SUN, K., TANG, X. H. & XIE, Y. K. 2015. Paclitaxel combined with harmine inhibits the migration and invasion of gastric cancer cells through downregulation of cyclooxygenase-2 expression. *Oncol Lett*, 10, 1649-1654.
- TAKAHARA, N., NAKAI, Y., ISHIGAMI, H., SAITO, K., SATO, T., HAKUTA, R., ISHIGAKI, K., SAITO, T., HAMADA, T., MIZUNO, S., KOGURE, H., YAMASHITA, H., ISAYAMA, H., SETO, Y. & KOIKE, K. 2021. A phase I study of intraperitoneal paclitaxel combined with gemcitabine plus nab-paclitaxel for pancreatic cancer with peritoneal metastasis. *Invest New Drugs*, 39, 175-181.

- TAN, H. L., KIM, G., CHARLES, C. J., LI, R. R., JANG, C. J., SHABBIR, A., CHUE, K. M., TAI, C. H., SUNDAR, R., GOH, B. C., BONNEY, G. K., LOOI, W. D., CHEOW, E. S., SO, J. B., WANG, L. & YONG, W. P. 2021. Safety, pharmacokinetics and tissue penetration of PIPAC paclitaxel in a swine model. *Eur J Surg Oncol*, 47, 1124-1131.
- TAVERNIER, C., PASSOT, G., VASSAL, O., ALLAOUCHICHE, B., DECULLIER, E., BAKRIN, N., ALYAMI, M., DAVIGO, A., BONNET, J. M., LOUZIER, V., PAQUET, C., GLEHEN, O. & KEPENEKIAN, V. 2020. Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) might increase the risk of anastomotic leakage compared to HIPEC: an experimental study. *Surg Endosc*, 34, 2939-2946.
- VAN DER KOLK, B. M., DE MAN, B. M., WOBES, T. & HENDRIKS, T. 1999. Is early post-operative treatment with 5-fluorouracil possible without affecting anastomotic strength in the intestine? *Br J Cancer*, 79, 545-50.
- WAWRUSZAK, A., GUMBAREWICZ, E., OKON, E., JELENIEWICZ, W., CZAPINSKI, J., HALASA, M., OKLA, K., SMOK-KALWAT, J., BOCIAN, A., RIVERO-MULLER, A. & STEPULAK, A. 2019. Histone deacetylase inhibitors reinforce the phenotypical markers of breast epithelial or mesenchymal cancer cells but inhibit their migratory properties. *Cancer Manag Res*, 11, 8345-8358.
- WEDEL, S., HUDAK, L., SEIBEL, J. M., MAKAREVIĆ, J., JUENGEL, E., TSAUR, I., WIESNER, C., HAFERKAMP, A. & BLAHETA, R. A. 2011. Impact of combined HDAC and mTOR inhibition on adhesion, migration and invasion of prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 28, 479-91.
- XI, W., CHEN, X., SUN, J., WANG, W., HUO, Y., ZHENG, G., WU, J., LI, Y., YANG, A. & WANG, T. 2018. Combined Treatment with Valproic Acid and 5-Aza-2'-Deoxycytidine Synergistically Inhibits Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma Growth and Migration. *Med Sci Monit*, 24, 1034-1043.
- XU, W. S., PARMIGIANI, R. B. & MARKS, P. A. 2007. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26, 5541-52.
- YAGI, Y., FUSHIDA, S., HARADA, S., KINOSHITA, J., MAKINO, I., OYAMA, K., TAJIMA, H., FUJITA, H., TAKAMURA, H., NINOMIYA, I., FUJIMURA, T., OHTA, T., YASHIRO, M. & HIRAKAWA, K. 2010. Effects of valproic acid on the cell cycle and apoptosis through acetylation of histone and tubulin in a scirrhous gastric cancer cell line. *J Exp Clin Cancer Res*, 29, 149.
- YANG, F., ZHAO, N., GE, D. & CHEN, Y. 2019. Next-generation of selective histone deacetylase inhibitors. *RSC Adv.*, 19571-19583.
- YANG, X. J., HUANG, C. Q., SUO, T., MEI, L. J., YANG, G. L., CHENG, F. L., ZHOU, Y. F., XIONG, B., YONEMURA, Y. & LI, Y. 2011. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy improves survival of patients with peritoneal carcinomatosis from gastric cancer: final results of a phase III randomized clinical trial. *Ann Surg Oncol*, 18, 1575-81.
- YUSUF, R. Z., DUAN, Z., LAMENDOLA, D. E., PENSON, R. T. & SEIDEN, M. V. 2003. Paclitaxel resistance: molecular mechanisms and pharmacologic manipulation. *Curr Cancer Drug Targets*, 3, 1-19.

- ZHANG, L., KANG, W., LU, X., MA, S., DONG, L. & ZOU, B. 2019. Weighted gene co-expression network analysis and connectivity map identifies lovastatin as a treatment option of gastric cancer by inhibiting HDAC2. *Gene*, 681, 15-25.
- ZHANG, L., WANG, G., WANG, L., SONG, C., WANG, X. & KANG, J. 2011. Valproic acid inhibits prostate cancer cell migration by up-regulating E-cadherin expression. *Pharmazie*, 66, 614-8.
- ZHAO, X., YANG, W., SHI, C., MA, W., LIU, J., WANG, Y. & JIANG, G. 2011. The G1 phase arrest and apoptosis by intrinsic pathway induced by valproic acid inhibit proliferation of BGC-823 gastric carcinoma cells. *Tumour Biol*, 32, 335-46.
- ZHOU, H. B. & ZHU, J. R. 2003. Paclitaxel induces apoptosis in human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol*, 9, 442-5.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie unter Betreuung von Prof. Dr. med. univ. Alfred Königsrainer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Prof. h.c. Marc André Reymond als Betreuer (Facharzt für Allgemein- und Viszeralchirurgie und Direktor des National Center for Pleura and Peritoneum (NCP)).

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglied Dr. hum. biol. Frank-Jürgen Weinreich von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte selbständig nach Anleitung durch Prof. Reymond.

Ich versichere, die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Herr Prof. Reymond hat die Arbeit betreut und die Doktorarbeit korrigiert.

Neu-Ulm, den

8 Veröffentlichungen

Teile der Dissertationsschrift wurden in einem Abstract bereits veröffentlicht:

Brauer L. HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR VALPROIC ACID AS A PREVENTION OF PERITONEAL GASTRIC CANCER RECURRENCE.

(Abstract). "ISSPP CONGRESS 2022 3RD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR THE STUDY OF PLEURA AND PERITONEUM" *Pleura and Peritoneum*, vol. 8, no. 1, 2023, pp. A1-A47.

<https://doi.org/10.1515/pp-2023-0010>

9 Danksagung

Dank gebührt zuerst meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Marc A. Reymond, für die fachliche und motivierende Betreuung.

Ebenso bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Alfred Königsrainer, für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines eigenen Arbeitsplatzes und seine Betreuung.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Dr. Weinreich für die hervorragende laboratorische Einarbeitung sowie seinen experimentellen Beistand, bei Frau Caroline Graf für ihre andauernde Motivation, bei Frau Yang QuianLu und bei allen weiteren Mitgliedern der NCPP-Arbeitsgruppe für die beste Zusammenarbeit und Beantwortung zahlreicher Fragen.

Und natürlich bedanke ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern, für ihre moralische Unterstützung während der gesamten Arbeitszeit.