

Aus der
Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen

**Einfluss der prä-analytischen Probenaufarbeitung auf
pharmakologische Messungen im Peritonealgewebe:
eine *ex-vivo* Studie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Castagna, Arianna
2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Königsrainer

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Stenzl

Tag der Disputation: 29.11.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
1.1 Stand der Wissenschaft	6
1.1.1 Das Peritoneum als semipermeable Membran	6
1.1.2 Peritonealmetastasen	7
1.2 Therapeutische Optionen bei peritonealer Metastasierung	7
1.2.1 Zytoreduktion und HIPEC	8
1.2.2 Die PIPAC Technologie	12
1.3 Vorteile der intraperitonealen Verabreichung von Zytostatika	16
1.4 Unterschiede zwischen der PIPAC und HIPEC-Techniken	17
1.4.1 Modelle zur Optimierung der intraperitonealen Medikamentengabe	18
1.5 Fragestellung	20
1.6 Hypothesen	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Studienaufbau	23
2.2 Rechtliche und ethische Rahmenbedingungen	24
2.3 Das IBUB Modell	25
2.4 Zytostatikallösungen	27
2.4.1 Cisplatin	27
2.4.2 Doxorubicin	28
2.5 Medikamentenapplikation	29
2.6 Biopsien	29
2.7 Präanalytische Probenvorbereitung	33

2.7.1	Lyophilisierung der Biopsien.....	33
2.7.2	Homogenisierung der Gewebeproben.....	35
2.8	Pharmakologische Messungen.....	37
2.8.1	Doxorubicin.....	38
2.9	Statistische Evaluation.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Einfluss der Biopsiegeometrie auf die Medikamentenkonzentration im Gewebe.....	40
3.1.1	Doxorubicin.....	40
3.1.2	Cisplatin.....	41
3.2	Einfluss der Gewebetrocknung auf die Konzentration.....	42
3.2.1	Doxorubicin.....	43
3.2.2	Cisplatin.....	43
3.3	Variabilität der Konzentrationsmessungen.....	44
3.3.1	Variabilität der Konzentrationsmessungen innerhalb der Harnblasen.....	45
3.3.2	Vergleich der Konzentrationsmessungen zwischen den verschiedenen Harnblasen.....	46
4	Diskussion.....	47
4.1	Intraperitoneale Chemotherapie.....	47
4.2	Präanalytik der Biopsien.....	49
4.3	Einsatz eines ex-vivo Rinderblasen-Modells.....	50
4.4	Einfluss unterschiedlicher Parameter auf die Biopsie-Entnahme.....	51
4.5	Schlussfolgerung.....	53
5	Zusammenfassung.....	55
6	Literaturverzeichnis.....	57
7	Erklärung zum Eigenanteil.....	67

8	Veröffentlichungen.....	68
9	Danksagung.....	69

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Peritoneal Cancer Index (PCI).....	9
Abbildung 2: Strategien für die intraperitoneale Medikamentenverabreichung	13
Abbildung 3: Intraperitoneale Druck Aerosolchemotherapie (PIPAC)	14
Abbildung 4: Studienaufbau.	24
Abbildung 5: Das optimierte invertierte Rinderharnblasenmodell (eIBUB)	26
Abbildung 6: Studienmedikation	28
Abbildung 7: Schematische Darstellung der experimentellen Vergleiche.....	30
Abbildung 8: Probenentnahmeschema im Rinderharnblasen-Modell.....	31
Abbildung 9: Entnahme von Proben aus der Rinderharnblase:.....	31
Abbildung 10: Lyophilisierungsanlage:	33
Abbildung 11: Gewebebiopsien vor und nach der Lyophilisierung:	34
Abbildung 12: Homogenisierungsprozess:	36
Abbildung 13: Probenhomogenisierung:	37
Abbildung 14: Gewebekonzentration von DOX in Abhängigkeit der Probengeometrie	41
Abbildung 15: Gewebekonzentration von Cisplatin in Abhängigkeit der Probengeometrie	42
Abbildung 16: Gewebekonzentration von DOX in nicht-benetzen Proben (NB) vs. benetzten Proben (B)	43
Abbildung 17: Gewebekonzentration von CIS in nicht-benetzen Proben (NB) vs. benetzten Proben (B)	44
Abbildung 18: Variabilität der Konzentrationsmessung innerhalb der Rinderharnblasen Gewebekonzentration für DOX (links) und CIS (rechts).	45
Abbildung 19: Vergleich der Konzentrationsmessungen von DOX und CIS zwischen den verschiedenen Rinderharnblasen.....	46

Abkürzungsverzeichnis

CRS:	Zytoreduktive Chirurgie
CIS:	Cisplatin
CO ₂ :	Kohlendioxid
DOX:	Doxorubicin
ePIPAC:	Elektrostatische Präzipitation PIPAC (electrostatic pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy)
eIBUB:	Optimierte umgestülpte Rinderharnblase (enhanced inverted bovine urinary bladder)
ETA-AAS:	Elektrothermische Atomisierung - Atom-Absorptions-Spektroskopie
EPIC:	Frühe postoperative intraperitoneale Chemotherapie (early postoperative intraperitoneal chemotherapy)
FAAS:	Flammen-Atom-Absorptions-Spektroskopie
GAGs:	Glykosaminoglykane
GLP:	Gute Laborpraxis (good laboratory practice)
HIPEC:	Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie (hyperthermic intraperitoneal chemotherapy)
HPLC:	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high-performance liquid chromatography)
IBUB:	Invertierte Rinderharnblase (inverted bovine urinary bladder)
IP:	Intraperitoneal
IQR:	Interquartile Range
IV:	Intravenös
KOF:	Körperoberfläche

- NIPEC: Normotherme intraperitoneale Chemotherapie (hyperthermic intraperitoneal chemotherapy)
- PCI: Peritoneal cancer index
- PD: Peritonealdialyse
- PIPAC: Intraperitoneale Hochdruck Aerosol Chemotherapie (Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy)
- RT: Raumtemperatur

1 Einleitung

Das Peritoneum ist eine Serosa, die den größten Teil der intraabdominalen Organe bedeckt. Die Etymologie des Wortes `Peritoneum` stammt aus dem altgriechischen περιτόνειον (peritóneion), das sich aus der Präfix περι- (peri) "um" und dem Verb τείνω (teino) "dehnen" zusammensetzt (Dictionary). Die Peritonealmembran hat ihren Ursprung in der embryonalen Mesodermis und ist die ausgedehnteste Serosa des Körpers. Sie umhüllt und deckt die in der Bauchhöhle befindlichen Organe ab und hat eine regulierende, mechanische und schützende Funktion (DiZerega and Rodgers 2012). Das Peritoneum hat eine Lamina parietale und eine Lamina viszerale und begrenzt die Bauchhöhle, indem es Ligamenta, Mesenterien und Omenta bildet. Die Serosastrukturen, die die Peritonealhöhle unterteilen, stellen gleichzeitig Begrenzungen, sowie Kanäle für die Ausbreitung von peritonealer Flüssigkeit, aber auch von Krankheiten dar. Die Kenntnis der Peritonealstruktur und -physiologie ist Voraussetzung für das Verständnis der Pathophysiologie des Peritoneums (Healy and Reznick 2000).

1.1 Stand der Wissenschaft

1.1.1 Das Peritoneum als semipermeable Membran

Die Peritonealmembran besteht aus drei Schichten: einer einfachen Plattenepithel-ähnlichen Monolage (Mesothel) und dem darunter liegenden Bindegewebe. Diese beiden Schichten sind durch eine dazwischenliegende Basalmembran voneinander getrennt (Nagy and Jackman 1998). Mesothelzellen präsentieren auf der Oberfläche Mikrovilli und Lamellarkörper, die Organellen sind mit Sekretions- und Speicherfunktionen ausgestattet. Über die Mikrovilli schließt eine Glykokalyx aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen (GAGs) Flüssigkeit ein und bildet eine stagnierende Flüssigkeitsschicht. Proteoglykane und Hyaluron sorgen für eine negative Polarität der Peritonealoberfläche und erhalten die Integrität einer semipermeablen Diffusionsbarriere (Van Baal et al. 2017). Aufgrund seiner relativ großen Oberfläche (ca. 2 m² bei Erwachsenen), seines hohen Inhalts an Kapillargefäße und seines relativ hohen Blutflusses kann es effektiv als endogene Dialysemembran zur Entfernung von Toxinen aus den

Körperflüssigkeiten (z. B. während der Peritonealdialyse (PD)) fungieren. Daher, eignet sich die Peritonealhöhle auch als Eintrittspforte für verschiedene intraperitoneal verabreichte Medikamente und Hormone (Flessner 2008; Rippe and Krediet 1994).

1.1.2 Peritonealmetastasen

Die peritoneale Metastasierung ist eine besondere Form der Tumorausbreitung bei den gastrointestinalen und gynäkologischen Tumorzellen, welche sich großflächig auf der inneren Bauchoberfläche ausbreiten. Peritonealmetastasen können isoliert, d.h. ohne simultane parenchymatöse Metastasen, auftreten. Aufgrund der Biologie und Pathophysiologie wird die peritoneale Metastasierung als lokoregionale Erkrankung angesehen (Coccolini et al. 2013). In bis zu 50% versterben Patienten durch Tumorrezidive bei Darmkrebs, Magenkrebs und epithelalem Ovarialkarzinom nicht durch Fernmetastasen, sondern durch loco-regionale Komplikationen der peritonealen Metastasierung (Coccolini et al. 2013). Die chirurgische und pharmakologische Behandlung ist nach wie vor eine große Herausforderung, da diese Diagnose mit einer kurzen Lebenserwartung verbunden ist (Chu et al. 1989; Roviello et al. 2011).

Neue Therapieansätze sind bei Peritonealmetastasen dringend notwendig. Die Erforschung des Peritoneums, dessen Physiologie und der pathophysiologischen Entstehung von Peritonealmetastasen ist die Voraussetzung, um innovative Therapien zu entwickeln. Das ultimative Ziel translationaler Ansätze ist das Langzeitüberleben und die Lebensqualität betroffener Patienten zu verbessern.

1.2 Therapeutische Optionen bei peritonealer Metastasierung

Behandlungsschemata die eine systemische Chemotherapie verwenden, haben sich nur als palliativ erwiesen, da sie die Überlebensraten von Patienten nicht erheblich verbessern. Die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung der peritonealen Metastasierung verbessert sowohl das Überleben als auch die Lebensqualität von Patienten mit peritonealer Manifestation intraabdominaler Malignome. Voraussetzung dafür ist, dass die peritoneale

Metastasierung auf die Bauchhöhle begrenzt sein sollte, wobei auch eine kurative Therapie möglich ist (Roviello et al. 2013).

1.2.1 Zytoreduktion und HIPEC

Hierbei kann die zytoreduktive Chirurgie (CRS) angewendet werden, die die radikale Entfernung der peritonealen Herde ermöglicht. Schon vor Jahrzehnten führte Paul Sugarbaker ein aggressives chirurgisches Verfahren ein, mit dem Ziel die peritoneale Metastasierung vollständig zu entfernen (Sugarbaker 1995; Desai and Moustarah 2019). Die Radikalität der Operation (sog. „Completeness of cytoreduction“) ist der entscheidende Prognosefaktor. Werden die Peritonealmetastasen chirurgisch komplett entfernt, so haben ausgewählte Patienten in Abhängigkeit von der Primärerkrankung reale Langzeitüberlebenschancen. So wurde bei kolorektalen Peritonealmetastasen in der PRODIGE 7 Studie ein medianes Überleben von 41 Monaten nach alleiniger zytoreduktiver Chirurgie erreicht (Quenet et al. 2018). Jedoch ist es chirurgisch sehr schwierig die peritoneale Tumorlast vollständig zu entfernen: aus diesem Grund empfahl Sugarbaker die zusätzliche Anwendung einer hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC) um die verbliebenen mikroskopischen Tumorherde zu eliminieren (Cascales-Campos et al. 2014).

Die lokoregionale Wirkung der intraperitonealen Chemotherapie besteht darin, die Wirksamkeit der Chemotherapeutika zu erhöhen, indem hohe Zytostatikakonzentrationen im Zielgewebe erreicht werden, während gleichzeitig die systemische Toxizität gering bleibt (Jacquet et al. 1997; Auer et al. 2020). Die perioperativ normotherme intraperitoneale Chemotherapie orientiert sich an diesem Prinzip.

CRS in Kombination mit HIPEC führt bei streng ausgewählten Patienten zu einer deutlichen Verlängerung des Überlebens (Sugarbaker 2018; Smith and Nathan 2019; Glehen et al. 2004; Coccolini et al. 2013). Leider können nicht alle Patienten davon profitieren: Für eine kurative Behandlung peritonealer Metastasen muss ein limitierter Befall vorliegen und es dürfen keine Metastasen in fernen Lymphknoten, in der Leber, oder an anderen extraperitonealen Lokalisationen vorhanden sein. Patienten die diese Kriterien erfüllen profitieren

wesentlich von einer CRS (Sugarbaker 1998). Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung einer CRS ist ein peritoneal cancer index (PCI) kleiner 17. Dieser quantitative Index wurde von Sugarbaker zur Auswahl geeigneter Patienten für das CRS Verfahren eingeführt und als prognostischer Indikator verwendet (Glehen, Gilly, Arvieux, et al. 2010). Bei Patienten, die auf eine „neoadjuvante“ Chemotherapie angesprochen haben, wird im Vorfeld eine diagnostische Laparoskopie zur quantitativen Evaluation des intraperitonealen Befalls durchgeführt. Die Peritonealhöhle wird in 9 Regionen unterteilt und der Dünndarm in weitere vier Regionen: Nach vollständiger Durchsicht aller parietalen und viszeralen Peritonealflächen wird der Index auf der Größe des Tumorimplantat-Durchmessers in jeder einzelnen Region berechnet. Alle Punkte werden dann addiert und es ergibt sich ein Gesamtindex mit einem Minimum von 0 und einem Maximum von 39 Punkten (Jacquet and Sugarbaker 1996b; Harmon and Sugarbaker 2005; Goéré et al. 2015) (Abbildung 1).

Peritoneal Cancer Index

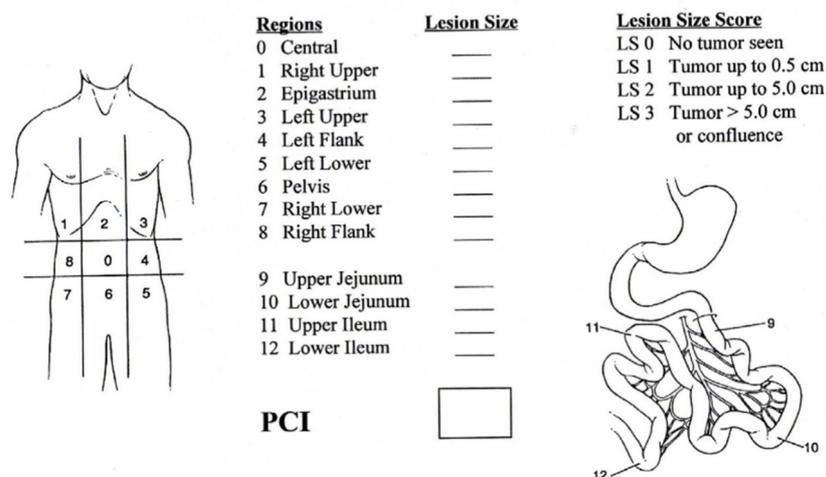


Abbildung 1: Peritoneal Cancer Index (PCI).

Schematische Darstellung der peritonealen Unterteilung zur Berechnung der PCI, welcher als prognostischer Indikator bei Peritonealkarzinose gilt (Harmon and Sugarbaker 2005).

Elias et al. konnten nachweisen, dass ein PCI höher 16 mit einer negativen Prognose verbunden ist (Elias et al. 2001) im Gegensatz zu Patienten mit einem PCI kleiner 6, welche die prognostisch günstigste Patienten-Subgruppe darstellt

(Glehen, Gilly, Arvieux, et al. 2010; Yonemura et al. 2010; Yonemura et al. 2012; Rau et al. 2020). Der kurative Therapieansatz der CRS mit begleitender HIPEC ist aktuell die erste Wahl bei Pseudomyxoma peritonei (Van Eden et al. 2019) und bei Patienten mit Mesotheliom (Broeckx and Pauwels 2018). Hierbei zeigte sich eine Verlängerung des medianes Überlebens von 6 Monaten beim nicht zytoreduzierten Patienten versus 34-92 Monaten bei behandelten Patienten (Yan et al. 2011; Helm et al. 2015; Schneider et al. 2018; Alexander Jr et al. 2013; Baratti et al. 2013).

Die postulierten Vorteile der HIPEC sind multipel: Dosisintensivierung durch die lokale Gabe, gute Exposition des Peritoneums durch manuelle Verteilung der zytotoxischen Lösung, pharmakologische Synergie durch die Hyperthermie (bei ausgewählten Chemotherapeutika) und direkte biologische Zytotoxizität der Hyperthermie. Durch die Applikation von Wärme (ein physikalisches Mittel) wird der Zelluntergang durch biologische Mechanismen potenziert, die die Nukleinsäuren, Zellmembranen und das Zytoskelett betreffen (Sugarbaker 2009). Darüber hinaus induziert die Hyperthermie eine tiefere Gewebepenetration der zytostatischen Wirkstoffe im Vergleich zur normothermen Verabreichung (Roviello et al. 2010; Sugarbaker 2009). Medikamente müssen auf dem parazellulären oder transzellulären Weg durch Tumoren diffundieren, um alle einzelnen Tumorzellen zu erreichen, da jede Zellschicht und die extrazelluläre Matrix das Eindringen der Medikamente verlangsamen (Esquis et al. 2006; Kusamura et al. 2021). Darüber hinaus wird die anatomische Peritoneum-Tumor-Barriere funktionell durch den hohen interstitiellen Tumordruck und die Wirkung des Kapillarnetzes beeinflusst, so dass Medikamente aus dem Tumorgewebe abgeleitet werden (Esquis et al. 2006; Kusamura et al. 2021).

Durch die lokoregionale Applikation der Wirkstoffe soll eine erhöhte Konzentration im Tumorgewebe im Vergleich zur intravenösen Gabe erreicht werden. Dank der regulierenden Funktion der Peritoneal-Plasma-Schranke wird die lokale Tumorexposition erhöht und gleichzeitig die systemische Wirkung und Toxizität reduziert (Davigo et al. 2020; Blanco et al. 2013; Coccolini et al. 2013). Jedoch impliziert eine hohe intraperitoneale Konzentration der Zytostatika nicht

unbedingt, dass eine ausreichende Gewebekonzentration der Chemotherapeutika erreicht wird (Solass et al. 2012). Die limitierte Eindringtiefe der Zytostatika in Tumorknoten ist eines der zentralen Probleme, die die Wirksamkeit der intraperitonealen Chemotherapie einschränkt (Flessner 2016).

Die einzige kurative Strategie bei peritonealer Metastasierung ist die Kombination aus maximaler zytoreduktiver Chirurgie und HIPEC. Zuerst wird die Tumormasse maximal auf eine infra-millimetrische Größe chirurgisch reduziert, dann kann die Zytostatika-Lösung in das verbliebene Resttumorgewebe eindringen und die Wirkstoffe zu den Lymphgefäßen transportieren um residuale Metastasen zu schädigen (Flessner 2016). Helderman et al. erklären, dass die Wirksamkeit einer HIPEC Behandlung von folgenden Parametern abhängig ist: die Wahl der Chemotherapie - abhängig von der Tumorentität, die Chemotherapiekonzentration, die Temperatur und das Volumen der Trägerlösung, die Dauer der Exposition, die Verabreichungstechnik und den Patientenkriterien. Weiterhin ist für die HIPEC-Therapie die begrenzte Penetration der Zytostatika in die Tumorknoten, die durchschnittliche Penetration beträgt nur wenige Millimeter, ein wesentlicher Faktor (Löke et al. 2021; Kusamura et al. 2008).

Folgende HIPEC Methoden sind in der Anwendung: die offene (*coliseum technique*) und die geschlossene Technik. Die offene Technik gewährleistet eine optimale Verteilung der Wärme und der zytotoxischen Lösung, hat aber den Nachteil des Wärmeverlusts, des Auslaufen der zytotoxischen Medikamente und die Kontamination des OP-Feldes. Die geschlossene Technik verhindert Wärmeverluste und das Auslaufen von Medikamenten, erhöht die Medikamentenpenetration, garantiert aber keine homogene Verteilung der Dialyseflüssigkeit (Lotti et al. 2016).

Um die Diffusion der Zytostatika in das Gewebe zu optimieren wurde der intra-abdominalen Druck während der HIPEC erhöht (Kusamura et al. 2021; Dedrick and Flessner 1997; Esquis et al. 2006; Jacquet et al. 1997). Kusamura et al. zeigten eine erhöhte Cisplatin-Konzentration im Peritoneum unter erhöhtem intraperitonealem Druck, aber einer ähnlichen Konzentration in Tumorknoten und

im subperitonealen Gewebe (Kusamura et al. 2021). Es wurde jedoch eine deutliche Abnahme des hepatischen Blutflusses und der Leberfunktion beobachtet. Beide Effekte waren auf den Zeitraum der HIPEC beschränkt, mit darauffolgender Normalisierung. Die bessere Gewebeaufnahme durch einen erhöhten intraabdominellen Druck könnte aber ein Argument für ein geschlossenes oder laparoskopisches HIPEC-Verfahren werden (Dupont et al. 2018). Lotti et al. haben die laparoskopische HIPEC-Technik beschrieben und eine gute Verteilung der Flüssigkeit in der Abdominalhöhle während der HIPEC mit geschlossenem Abdomen nachgewiesen (Lotti et al. 2016).

Trotz optimierter HIPEC-Technik konnte in der prospektiv randomisierten PRODIGE 7 Studie kein Überlebensvorteil durch CRS und HIPEC versus CRS allein nachgewiesen werden (Quenet et al. 2018).

1.2.2 Die PIPAC Technologie

Wenn die peritoneale Metastasierung aufgrund der Ausbreitung des peritonealen Befallen nicht chirurgisch therapierbar ist, stellt eine palliative systemische Chemotherapie die Standardbehandlung dar (Odendahl et al. 2015). Die Wirksamkeit dieses Verfahrens wird jedoch erstens durch Einschränkungen, wie dem erhöhten intratumoralen Flüssigkeitsdrucks und zweitens durch die begrenzte Oberflächenexposition des Peritoneums und die schlechte Gewebepenetration eingeschränkt (Markman 2003): Deshalb wird zunehmend eine intraperitoneale (IP) Zytostatika-Applikation bei peritonealer Metastasierung eingesetzt. (Odendahl et al. 2015). Zur Optimierung der IP-Therapie werden verschiedene neue innovative Techniken der intraperitonealen Verabreichung von Zytostatika experimentell untersuchen. Zu diesen neueren Techniken gehören z. B. die Applikation von Aerosolen unter Druck in Verbindung mit Formulierungen wie Mikropartikeln, Nanopartikeln und Nanogelen sowie in den Tumor penetrierenden Peptiden (Abbildung 2).

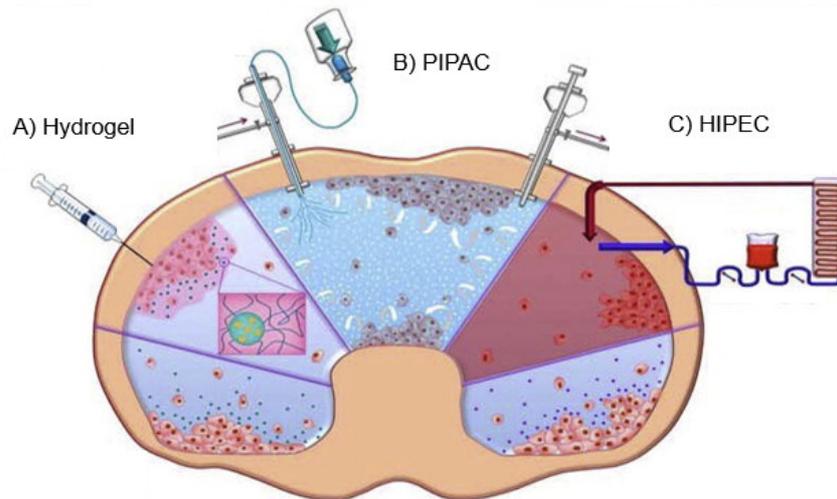


Abbildung 2: Strategien für die intraperitoneale Medikamentenverabreichung.
 Verschiedene Modalitäten können angewendet werden: A) Hydrogele B) PIPAC: intraperitoneale Hochdruck Aerosolchemotherapie; C) HIPEC: hypertherme intraperitoneale Chemotherapie. (Dakwar et al. 2017).

Die intraperitoneale Hochdruckapplikation von Aerosolchemotherapie (Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy, PIPAC) geht mit einer raschen und homogenen Verteilung des Aerosols im Abdomen einher. Die PIPAC ist ein innovativer Behandlungsansatz, die auf dem Konzept des „therapeutischen Capnoperitoneums“ beruht (Reymond et al. 2000). Dieses Konzept des geschlossenen Behandlungsraumes (entspricht dem Abdomen während einer Laparoskopie), verändert die chemischen, pharmakologischen, und biologischen Bedingungen im Raum. Die PIPAC (Abbildung 3) kombiniert das Prinzip des therapeutischen Capnoperitoneums mit der Aerolisierung der Chemotherapeutika (Solaß et al. 2013):

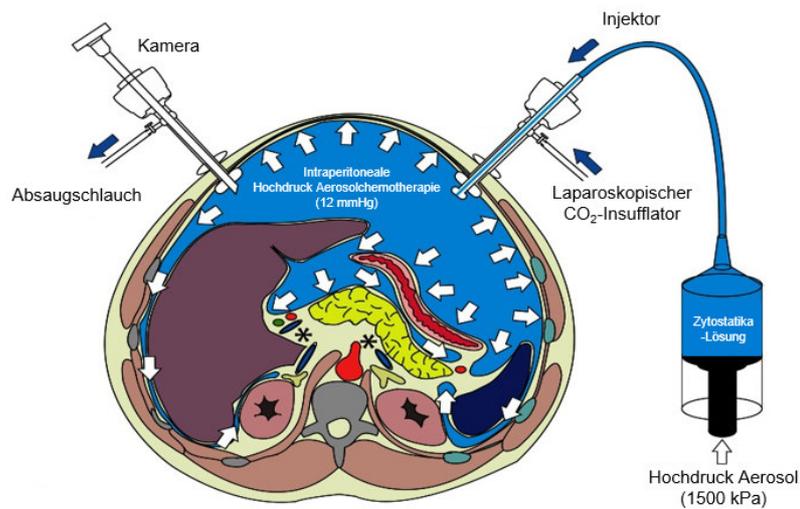


Abbildung 3: Intrapertoneale Druck Aerosolchemotherapie (PIPAC)

In einem ersten Schritt wird ein normothermes Capnoperitoneum mit einem Druck von 12mmHg bei Körpertemperatur hergestellt. Eine Chemotherapie-Lösung (etwa 10 % einer normalen systemischen Dosis) wird mit einem Vernebler in die dicht verschlossene Bauchhöhle aerosoliert. Danach bleibt das therapeutische Aerosol über 30 Minuten im Kontakt mit dem Peritoneum, bevor es über ein geschlossenes Leitungs- und Filtersystem sicher entsorgt wird. (Solass et al. 2014)

Die PIPAC basiert auf physikalischen Formen der Materie. In der soliden Form hat ein Körper ein Volumen und eine Form, eine Flüssigkeit ein Volumen und keine Form, ein Gas kein Volumen und keine Form. Da ein Aerosol einen Zustand zwischen einer Flüssigkeit und einem Gas bildet, ist die räumliche Verteilung eines Aerosols in einem geschlossenen Raum physikalisch immer besser als die einer Flüssigkeit. Dieses physikalische Prinzip konnte am Beispiel der intraperitonealen Applikation nachgewiesen werden. Die Verteilung einer Methylenblau-Lösung war nach PIPAC (Aerosol) vs. intraperitonealen Lavage (Flüssigkeit) deutlich besser (Solaß et al. 2012). Jedoch ist ein Aerosol kein perfektes Gas, denn die Verteilung ist von der Tröpfchengröße und der Sedimentierung über die Zeit abhängig (Khosrawipour, Khosrawipour, Diaz-Carballo, et al. 2016; Solaß et al. 2012). So besteht nach PIPAC ein Medikamentenkonzentrations-Gradient im Gewebe, der von der anterioren Bauchwand zu den darunter liegenden Organen zunimmt. So ist beim liegenden Patienten die Medikamentenkonzentration dorsal im Abdomen am größten.

Ein Chemotherapeutikum sollte Krebszellen möglichst in einer zytotoxischen Konzentration erreichen um zu wirken. Wie die Hirnblutsschranke ist das Peritoneum eine hochwirksame Barriere gegen den Verlust von Makromolekülen (wie Albumin aber auch Chemotherapeutika) in die Bauchhöhle. Sowohl der osmotische als auch der hydrostatische Druck der interstitiellen Flüssigkeit sind in soliden Tumoren erhöht. Dieser interstitielle Flüssigkeitsdruck beschränkt die effiziente Gewebeaufnahme von Medikamenten (Heldin et al. 2004). So wird die Eindringtiefe von Chemotherapeutika durch passive Diffusion beschränkt.

Die physikalischen Prozesse der Konvektion und, im geringeren Umfang, der Diffusion spielen eine zentrale Rolle bei der Aufnahme von Chemotherapeutika in peritoneale Tumore. Diffusionskräfte spielen bei der Gewebeaufnahme von Makromolekülen nur eine untergeordnete Rolle (Löke et al. 2021). Konvektive Kräfte spielen in diesem Prozess eine viel wichtigere Rolle. Theoretisch soll ein künstlich hergestellter intraabdominaler Druck den erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck überwinden und einen konvektiven Fluss entlang des Druckgradienten erzeugen, der die makromolekularen Substanzen in das Tumorgewebe transportiert. Diese Hypothese wurde zuerst von Jacquet, dann von vielen anderen bestätigt: durch einen künstlich erhöhten intraperitonealen Druck kann die Medikamentenpenetration in das Gewebe erhöht werden (Esquis et al. 2006; Jacquet et al. 1996).

Die PIPAC erfüllt die Voraussage von Dedrick und Flessner: *„The solution of these two problems (limited penetration and poor exposure) could potentially improve, perhaps dramatically, the efficacy of the procedure“* (Dedrick and Flessner 1997).

Zusätzlich zu einer besseren Gewebepenetration und einer Verabreichung der IP Therapie durch einen minimal invasiven Eingriff, bietet die PIPAC die Möglichkeit einer wiederholten Applikation ohne eine Beeinträchtigung der Lebensqualität (Odendahl et al. 2015). Horvath et al. und Nadiradze et al. zeigten dass ein Gesamtüberleben von 13-15 Monaten bei inoperablen Patienten nach Einsatz der PIPAC Therapie möglich ist (Horvath et al. 2018; Nadiradze et al. 2016). Zudem kann eine 1-Jahres Überlebensrate bei Patienten mit

siegelringzelligem Adenokarzinom des Magens, nach Versagen der systemischen Chemotherapie, bei über 30% der Fälle erreicht werden (Gockel et al. 2018).

1.3 Vorteile der intraperitonealen Verabreichung von Zytostatika

Bereits in 1978 zeigten Dedrick et al., dass die peritoneale Clearance bestimmter Chemotherapeutika viel geringer ist als die Plasma-Clearance: Pharmakokinetische Berechnungen deuteten darauf hin, dass flüssige Medikamente in großen Mengen intraperitoneal verabreicht werden können und eine deutlich höhere Konzentration im Peritonealraum als im Plasma aufweisen. Aus diesem Grund ist bei der intraperitonealen Verabreichung vieler Medikamente ein erheblicher Konzentrationsunterschied zwischen der Peritonealhöhle und dem Plasma festzustellen. Dieser Konzentrationsunterschied ist ein pharmakologischer Vorteil bei der Behandlung von Peritonealmetastasen (Dedrick et al. 1978). Dies wurde durch mehrere Studien validiert, in denen die intraperitoneale Medikamentenverteilung untersucht wurde (Los and McVie 1990; Hasovits and Clarke 2012). Die klinische Wirksamkeit der intraperitonealen Therapie hat zwei offensichtliche Probleme zu adressieren. Das erste Problem liegt in der begrenzten Penetration des Medikaments in das Gewebe, das zweite in der Exposition der Serosa-Oberfläche gegenüber der Chemotherapeutikallösung (Dedrick and Flessner 1997).

Alberts et al zeigte, dass im Vergleich zu intravenösem (IV) Cisplatin, intraperitoneales Cisplatin das Überleben verbessert und zusätzlich weniger toxische Nebenwirkungen bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Stadium III und geringer Resttumormassen gleich oder kleiner 2 cm auftreten (Alberts et al. 1996). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer weiteren Phase-III-Studie von Markman et al. (Markman et al. 2001) nachgewiesen, die eine experimentelle Behandlung mit IV Carboplatin, gefolgt von IP Paclitaxel und IV Cisplatin untersuchten. Im Vergleich zu einer systemischen Standardbehandlung mit

intravenösem Cisplatin und Paclitaxel wurde eine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens erzielt (Markman et al. 2001).

1.4 Unterschiede zwischen der PIPAC und HIPEC-Techniken

Eveno et al. untersuchten die pharmakokinetische Wirkung bei PIPAC *ex-vivo* und im Tiermodell: Die Rate der apoptotischen und proliferativen Zellen, sowie das Ausmaß der Oxaliplatin-Penetration in den Tumor war in der PIPAC-Gruppe höher. Dagegen war die Penetration und Durchdringung durch das Peritoneum geringer, und somit die systemische Toxizität vermutlich reduziert (Eveno et al. 2017). Davigo zeigte im Grosstiermodell, dass die PIPAC mit einem intraperitonealen Druck von 12-15 mmHg eine bessere lokale Bioverfügbarkeit des Medikaments mit homogener Verteilung und Gewebepenetration als nach HIPEC aufweist (Davigo et al. 2020).

Nachdem die PIPAC meist in mehreren Sitzungen appliziert wird (im Mittel dreimal, weitere Zyklen sind aber bei ausgewählten Patienten möglich) ist die Medikamentenaufnahme in den Tumor und im Aszites erhöht und steigert sich nach jeder Anwendung (Lehmann et al. 2018; Tempfer, Hilal, et al. 2018; Robella et al. 2019; Castagna et al. 2021).

Die pharmakologischen Eigenschaften der PIPAC ermöglichen somit mit einer niedrigeren Dosierung, eine höhere Wirkstoffkonzentration im Gewebe, ein tieferes Eindringen der Wirkstoffe und eine geringere systemische Absorption: Diese niedrige Dosierung trägt wahrscheinlich zur guten Verträglichkeit des Verfahrens bei (Kurtz et al. 2018).

Ein wesentlicher Vorteil der PIPAC ist die Verifizierung der therapeutischen Wirkung durch wiederholte Biopsien und der Klassifizierung mittels eines validierten Tumorregression-Gradings, das sog. PRGS (Solass et al. 2016; Castagna et al. 2021). Auch weiterführende molekulare Untersuchungen an den wiederholten Biopsien sind möglich: so öffnen sich neue Möglichkeiten für die individuelle Therapie von Peritonealmetastasen.

Eine innovative Weiterentwicklung der PIPAC ist die sogenannte elektrostatische PIPAC (electrostatic pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy, ePIPAC): Das elektrostatische Laden des Aerosols und die darauffolgende Präzipitation kann die pharmakologischen Eigenschaften der PIPAC noch weiter verbessern. Kakchekeeva et al. konnten nachweisen, dass die ePIPAC technisch durchführbar ist und die Gewebeaufnahme von zwei Testsubstanzen im Vergleich zur PIPAC um das bis zu zehnfache verbessert. Die ePIPAC hat darüber hinaus das Potenzial, einer effizienteren Medikamentenaufnahme, mit dem Potenzial einer Dosisreduzierung und somit Verkürzung der PIPAC-Anwendung (Kakchekeeva et al. 2016). Die erste Anwendung am Menschen wurde 2016 publiziert (Reymond et al. 2016). Inzwischen sind die ersten Ergebnisse einer randomisierten klinischen Studie verfügbar, die die Wirksamkeit und die Sicherheit der ePIPAC dokumentieren (Somashekhar et al. 2022).

1.4.1 Modelle zur Optimierung der intraperitonealen Medikamentengabe

Reproduzierbare Modelle sind für die Optimierung der intraperitonealen Therapieverfahren erforderlich (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019). *In-vivo* Experimente am Tiermodell wären die erste Wahl (Toussaint et al. 2021; Khosrawipour, Khosrawipour, Diaz-Carballo, et al. 2016), wobei allerdings *ex-vivo* oder *post-mortem* Experimente vorangestellt werden müssen (Khosrawipour, Khosrawipour, Kern, et al. 2016; Schnelle et al. 2017).

Als experimentelles Modell einer Peritonealhöhle ist ein geschlossener Kunststoffbehälter, in dem Gewebefragmente gelegt wurden und dann mit Zytostatika behandelt wurden, einfach und gut reproduzierbar (Khosrawipour, Khosrawipour, Diaz-Carballo, et al. 2016). Ein solches Modell ist jedoch suboptimal, da in die Kunststoffoberflächen keine Substanzen eindringen können, die Aerosoltröpfchen an der kälteren Wand kondensieren und schnell auf den Boden des Behälters laufen (Schnelle et al. 2017; Khosrawipour, Khosrawipour, Diaz-Carballo, et al. 2016).

Ein deutlicher Fortschritt war dann das Modell der „umgestülpten“ Rinder-Harnblase (Inverted Bovine Urinary Bladder, IBUB) (Schnelle et al. 2017). Das

IBUB ist ein einfaches *ex-vivo* Modell des Abdomens da die gesamte Innenfläche mit Peritoneum überzogen ist. Das Volumen der expandierten Blase liegt bei 3 bis 5 Liter Kohlendioxid (CO₂). Der therapeutische Raum ist dem menschlichen Abdomen ähnlich. Am Blasenausgang wird ein Trokar eingeführt und ein Capnoperitoneum von 12-15 mmHg erzeugt, sodann einen Vernebler eingeführt um die Zytostatika als Aerosol applizieren zu können. Das IBUB-Modell ist einfach in der Handhabung, reproduzierbar und kostengünstig. Es ermöglicht pharmakologische und biologische Analysen, sowie histologische Untersuchungen. Allerdings sind keine wiederholten Messungen möglich. Das heißt Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten erfordert einen neuen Untersuchungsaufbau. Letztlich erfüllt dieses Modell auch die Anforderungen der Arbeitssicherheit da die Experimente in einem geschlossenen System stattfinden.

Das Pilot IBUB Modell wurde von Sautkin et al. weiterentwickelt, um Echtzeitmessungen zu ermöglichen und zwischen der Gewebeaufnahme aus einem Aerosol und einer Flüssigkeit unterscheiden zu können (Sautkin et al. 2019). Das Prinzip des optimierten IBUB-Modells (enhanced Inverted Bovine Urinary Bladder, eIBUB) basiert auf dem Prinzip der kommunizierenden Gefäße. Zwei Gefäße, die Rinderblase selbst und ein separater geschlossener Kunststoffbehälter sind mit einem Schlauch so verbunden, dass beide Gefäße mit CO₂ bei gleichem Druck aufgefüllt sind, und jedes Gefäß gesondert auf einer eigenen Waage angebracht ist. Diese Konstruktion ermöglicht die Bestimmung des Gewichts der Rinderblase und des verbundenen Gefäßes in Echtzeit. Die Gewichtszunahme der Blase und des Gefäßes entspricht der Flüssigkeitsaufnahme in das Gewebe bzw. dem sich abscheidenden Aerosol (Sautkin et al. 2019).

Die Ergebnisse, die unter den identischen Versuchsbedingungen im IBUB- und im eIBUB-Modell erreicht wurden, zeigten in beiden Modellen einen statistisch signifikanten vertikalen Cisplatin Konzentrationsgradienten. Während jedoch die Gewebekonzentrationen von Cisplatin im oberen und mittleren Teil der Harnblase vergleichbar waren, war sie im unteren Teil der eIBUB geringer. Dieser Unterschied in der Gewebekonzentration lässt sich dadurch erklären, dass sich

in der eIBUB keine Flüssigkeit am tiefsten Punkt ansammelt (Sautkin et al. 2019; Castagna et al. 2021; Castagna et al. 2020).

1.5 Fragestellung

Die Anreicherung von Arzneimitteln und ihrer Metabolite in menschlichem und tierischem Gewebe ist ein wichtiger Aspekt in der Entwicklung neuer Medikamente. Die Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen im Zielgewebe sind pharmakologisch unerlässlich (Xue et al. 2012).

Entscheidend dabei ist die Gewebeaufarbeitung die die Messungen erheblich beeinflussen kann und deswegen ein wichtiger Faktor für die Interpretation der Ergebnisse ist (Magnette et al. 2016). Die Quantifizierung von Zytostatikakonzentrationen im Gewebe hängt von präanalytischen und analytischen Aspekten ab. Der präanalytische Vorgang muss standardisiert und reproduzierbar sein, wichtig ist zudem die Minimierung von Probenentnahmefehlern (Castagna et al. 2021; Li and Bartlett 2014; Sautkin et al. 2019; Smith and Xu 2012). Damit die Resultate verifiziert werden können, verlangen die regulatorischen Behörden standardisierte Messmethoden in GLP-zertifizierten Laboren. Gefordert wird auch eine ausreichende Anzahl an Proben und Kontrollen um die biologische Variabilität zwischen den Proben zu berücksichtigen (Sautkin et al. 2019; Castagna et al. 2021).

In Vorarbeiten wurden präanalytische und analytische Methoden zur Bestimmung der Medikamentenkonzentration im Gewebe erhoben (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019): Für die Validierungen fehlen Daten zum Einfluss zweier wichtiger präanalytischer Faktoren auf die Medikamentenkonzentrations-Messung: die Geometrie der Biopsien sowie der Einfluss eines Medikamentenfilms auf der Gewebe-Oberfläche.

1) Geometrie der Biopsien

Das Eindringen von Arzneimitteln in das Peritonealgewebe ist begrenzt: zum Beispiel wurde die Gewebepenetration von Doxorubicin nach HIPEC in nur vier bis sechs Zellschichten nachgewiesen, was einem Abstand von der Oberfläche von nur 10-30 µm entspricht (de Bree et al. 2017). Es ist daher zu erwarten, dass

sich der größte Teil des Chemotherapeutikums in den oberflächlichen Gewebeschichten befindet. Somit hat die Geometrie für die Medikamentenkonzentrations-Messung Bedeutung, denn das Verhältnis Oberfläche zu Tiefe bestimmt die Konzentration: Das heißt breitere oberflächige Biopsien weisen eine höhere Konzentration auf (Solass et al. 2016; Castagna et al. 2021).

2) Flüssigkeitsfilm an der Oberfläche der Zielstruktur

Bei Gewebekonzentrations-Messungen sollte die Konzentration eines Medikamentes außerhalb des Gewebes nicht erfasst werden. Obwohl im Rinderharnblasen-Modell überflüssige Lösung abfließt, bleibt die innere Blasenoberfläche nach dem Aerosolisieren der Chemotherapeutika mit einem Flüssigkeitsfilm beschichtet (Castagna et al. 2021). So könnte bei hoher intraperitonealer Konzentration und geringer Eindringtiefe eine höhere Gewebekonzentration gemessen werden, als bei einem Medikament mit niedriger intraperitonealer Konzentration und höherer Eindringtiefe in das Gewebe (Castagna et al. 2021).

1.6 Hypothesen

Diese methodologische Studie untersucht den Einfluss der Probengeometrie und der präanalytischen Aufarbeitung auf Medikamentenkonzentrationsmessungen in Peritonealbiopsien.

Die erste Hypothese war, dass die Medikamentenkonzentration von der Probengeometrie abhängig ist. Daher wurden standardisierte Biopsien aus der Rinderharnblase- mit zwei unterschiedlichen Durchmessern (6 mm und 12 mm) entnommen und die Zytostatikakonzentration im Gewebe gemessen.

Die zweite Hypothese war, dass das Vorhandensein eines Flüssigkeitsfilms auf der Oberfläche der Biopsie die Wirkstoffkonzentration verfälscht: Daher wurden Konzentrationsmessungen mit und ohne Trocknung der Oberfläche verglichen.

Es wurde die Gewebekonzentration von zwei Zytostatika, Cisplatin (CIS) und Doxorubicin (DOX), die in der klinischen Therapie von Peritonealmetastasen

häufig eingesetzt werden, gemessen. Da CIS im Gegensatz zu DOX tiefer in das Peritonealgewebe eindringt, haben wir unterschiedliche Ergebnisse zwischen beiden Substanzen erwartet.

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Der Studienaufbau wird in der Abbildung 4 grafisch dargestellt. Zielgröße war die Konzentration von zwei Chemotherapeutika im Blasenwandgewebe: CIS und DOX. Dabei wurde der Einfluss von zwei Faktoren auf diese Zielgröße bestimmt: die Geometrie der Biopsien und das Vorhandensein eines oberflächlichen Flüssigkeitsfilms.

Zu diesem Zweck wurden CIS und DOX als Aerosol in drei invertierten Rinderharnblasen (eIBUBs) appliziert. Nach Absaugen des therapeutischen Aerosols und Eröffnung der Organe wurden zylindrische, transmurale Biopsien an drei verschiedenen Stellen der Blase (oben, im mittleren Bereich, und unten) entnommen, um den vertikalen Konzentrationsgradient nach Behandlung zu erfassen.

Die standardisierten Gewebeproben hatten dieselbe Tiefe, aber unterschiedliche Durchmesser (6 mm vs. 12 mm). Parallel dazu wurde die überschüssige Zytostatikalösung auf der Blaseninnenseite in der Hälfte der Proben abgetupft und größtenteils eliminiert.

Alle Experimente wurden dreifach wiederholt. Die Medikamentenkonzentration wurde in einem externen, GLP-zertifizierten Labor bestimmt. Das Labor kannte die Probenidentität dabei nicht. Anschließend wurden die Ergebnisse entblindet und die Korrelation zwischen der Medikamentenkonzentration im Gewebe und der Probenaufarbeitung untersucht (Castagna et al. 2021).

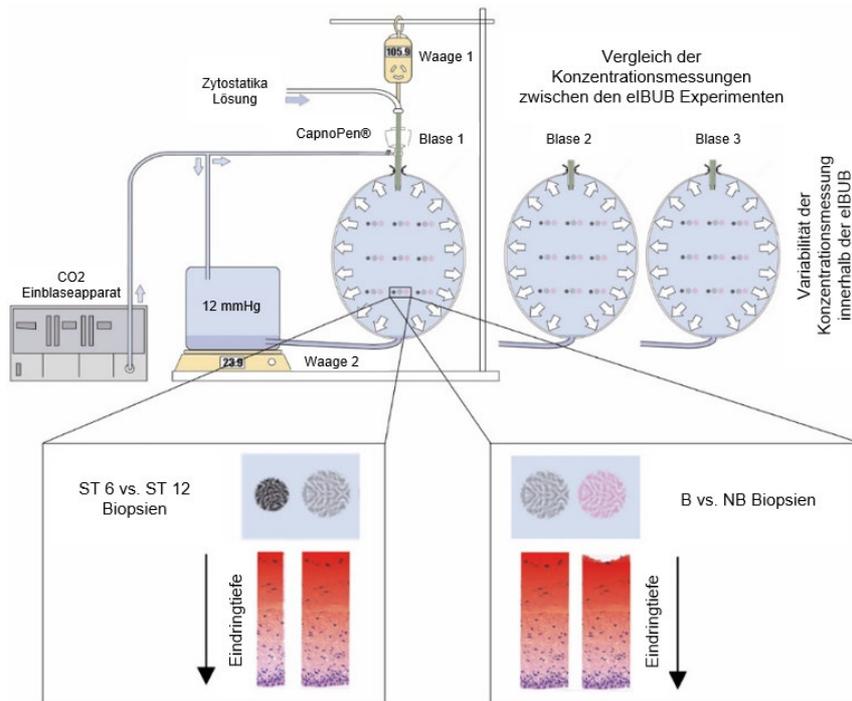


Abbildung 4: Studienaufbau.

Schematische Darstellung des Studiendesigns. Einfluss der Biopsiegeometrie: Stanzenbiopsien 6 mm (ST6) vs. 12 mm (ST12) wurden im oberen, mittleren und unteren Teil der Rinderharnblase entnommen (linker Kasten). Einfluss der Restlösungsflüssigkeitsschicht auf der Oberfläche: ST12 wurden oben, in der Mitte und unten an der Rinderharnblase entnommen, bevor und nachdem die Oberfläche des Modells abgetupft wurde (benetzt (B) vs. nicht benetzt (NB)). Die CIS- und DOX-Gewebekonzentration wurde gemessen und zwischen den verschiedenen Gruppen verglichen. Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt (Castagna et al. 2021).

2.2 Rechtliche und ethische Rahmenbedingungen

In dieser Studie wurde kein menschliches Material und auch keine lebenden Tiere eingesetzt. Frische Rinderblasen wurden vom Schlachthof (Metzgerei Raiser, 72074 Tübingen) als Restprodukt gekauft. Der Deutschen Gesetzgebung nach war für die Durchführung dieser Studie keine Genehmigung des Institutional Review Board oder des Tierschutzausschusses erforderlich. Das Studienprotokoll wurde der „doctoral school“ vorgelegt und es wurden keine Einwände geäußert.

Weiterhin erforderte die Arbeit die Anwendung von toxischen Chemotherapeutika. Ohne Risikominimierungs-Maßnahmen könnten Mitarbeiter, die den Zytostatika ausgesetzt wären, gesundheitliche Schäden

davontragen. Das Labor des Nationalen Zentrums für Pleura und Peritoneum (N CPP) ist auf die Manipulation von zytostatischen Aerosolen spezialisiert und wurde im Herbst 2016 von der Unfallkasse Baden-Württemberg erfolgreich auditiert. Nur geschultes Personal darf Experimente durchführen oder an Experimenten teilnehmen. Die Verabreichung von CIS und DOX als Aerosol sowie die Entnahme der Biopsien erfolgten unter einer für Zytostatika zertifizierten Sicherheits-Werkbank der Klasse 3 (Maxisafe 2000, ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland).

Die Arbeitsflächen des Labors werden regelmäßig gereinigt. Zur Sicherheit werden Arbeitsflächen zusätzlich auf eine mögliche Kontamination mit Platinhaltigen Zytostatika zweimal jährlich über Wischproben untersucht. Ebenso wurde eine Luftkontamination durch Platin von einem externen Labor mit mehreren negativen Messungen ausgeschlossen (Klinikum der Universität München, Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin) (Castagna et al. 2021).

2.3 Das IBUB Modell

In dieser Arbeit wurde das im N CPP-Labor etablierte IBUB (Inverted Bovine Urinary Bladder) Modell angewendet. (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019; Schnelle et al. 2017). Die Rinderharnblase ist ein intraperitoneales Organ, und ihre äußere Oberfläche ist vollständig mit Peritoneum bedeckt. Wird die Blase von innen nach außen gestülpt (inside-out), besteht nun die innere Oberfläche der Blase aus einer Peritonealschicht. Durch die Herstellung eines Kohlendioxid Capnoperitoneums kann ein ähnliches Volumen wie in der menschlichen Bauchhöhle hergestellt werden (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019; Schnelle et al. 2017).

Bei der Aerosolisierung im IBUB-Modell sammelt sich Flüssigkeit am Boden der Harnblase. Um dies zu vermeiden, wurde ein optimiertes Modell entwickelt, das „enhanced IBUB model (eIBUB)“ (Abbildung 5). Ein zweites Gefäß wird über einen Silikon-Schlauch an den Blasenboden angeschlossen und unter denselben CO₂-Druck gesetzt. Nach dem Prinzip der kommunizierenden Gefäße wird die

sich ansammelnde Flüssigkeit laufend aufgefangen und abgeleitet. Die Harnblase und das Gefäß werden auf einer digitalen Waage montiert. Diese Montage ermöglicht die Messung der Menge des Aerosols und der Flüssigkeit, sowie in Echtzeit die Messungen der Flüssigkeitsaufnahme im Gewebe (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019).

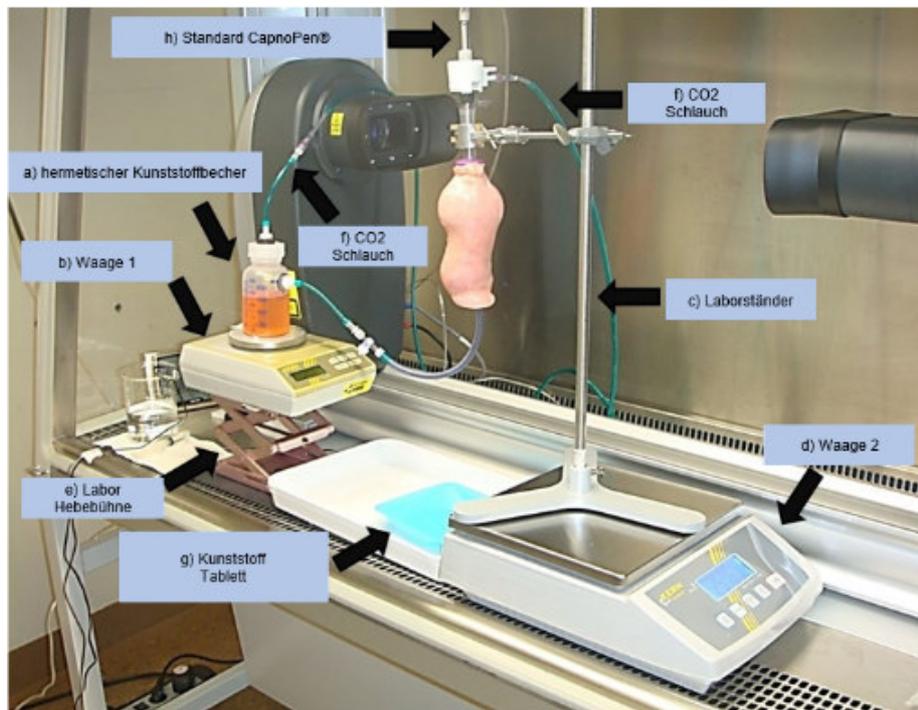


Abbildung 5: Das optimierte invertierte Rinderharnblasenmodell (eIBUB)

Eine frisch explantierte Rinderharnblase wird umgestülpt und an einem zweiten Gefäß angeschlossen. Die Harnblase und das Gefäß werden auf separate Waagen platziert. So sind Echtzeitmessungen der Flüssigkeitsaufnahme in das Gewebe möglich. Abkürzungen: a) hermetischer Kunststoffbecher; b) Waage 1; c) Laborständer; d) Waage 2; e) Labor Hebebühne; f) CO₂ Schlauch; g) Kunststoff Tablett; h) Vernebler (CapnoPen®). (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019).

Frische Rinderharnblasen vom Schlachthof wurden unmittelbar nach der Entnahme in das NCPP-Labor auf Eis geliefert. Während der Versuchsvorbereitung wurden die Organe in einem Kühlschrank bei einer Temperatur von +4°C gelagert. Anschließend wurden die Rinderblasen gereinigt, präpariert und von innen nach außen invertiert. Unter fließendem Wasser wurde überschüssiges Fettgewebe herauspräpariert. Dann wurde ein 12 mm Trokar (Kii®, Applied Medial, Düsseldorf, Deutschland) mit einer Mersilene®-Naht fest

an der Blasenhalsoffnung vernäht. Außerdem wurde der Abfluss der Restflüssigkeit durch das Anbringen eines zusätzlichen Silikonschlauchs gewährleistet. Durch das Einleiten von CO₂ in die Blase über den Trokaranschluss wird ein Capnoperitoneum mit einem Druck zwischen 12-15 mmHg etabliert. Auch das zweite Gefäß wurde unter demselben Druck mit CO₂ aufgefüllt. Nach dem Prinzip der kommunizierenden Gefäße sammelte sich somit keine Flüssigkeit in der Harnblase (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019).

2.4 Zytostatikalösungen

In der gastrointestinalen und gynäkologischen Onkologie werden vorwiegend Doxorubicin, Cisplatin, Oxaliplatin, 5-Fluorouracil, Taxane, Irinotecan, Adriamycin oder Mitomycin C für die intraperitoneale Applikation eingesetzt (González-Moreno, González-Bayón, and Ortega-Pérez 2010; Huang et al. 2017; Sugarbaker 2012). In der vorliegenden Arbeit haben wir uns auf Medikamente fokussiert, die bei der PIPAC am häufigsten eingesetzt werden: CIS und DOX (Abbildung 6).

2.4.1 Cisplatin

Cis-Diamindichlorplatin(II) (als CDDP oder Cisplatin bekannt), wird zur Behandlung einer Vielzahl solider bösartiger Tumore eingesetzt, darunter Hoden-, Eierstock-, Kopf- und Hals-, Kolorektal-, Blasen- und Lungenkrebs (Galluzzi et al. 2012). CIS übt seine krebshemmende Wirkung unter anderem durch die Erzeugung von DNA-Läsionen, gefolgt von der Aktivierung der DNA-Schadensreparatur sowie der Induktion der mitochondrialen Apoptose (Galluzzi et al. 2012). Trotz konsistenter Rate eines anfänglichen Ansprechens entwickeln sich Chemoresistenzen (Galluzzi et al. 2012). Die ersten Ergebnisse einer PIPAC mit niedrig dosiertem CIS und DOX wurden bei einem Patienten mit chemoresistenten Peritonealmetastasen eines Magenkarzinoms erzielt (Nadiradze et al. 2020): Bei der Hälfte der Patienten wurde ein objektives histologisches Ansprechen des Tumors dokumentiert, darunter sechs Patienten mit einer vollständigen histologischen Remission (Nadiradze et al. 2020).

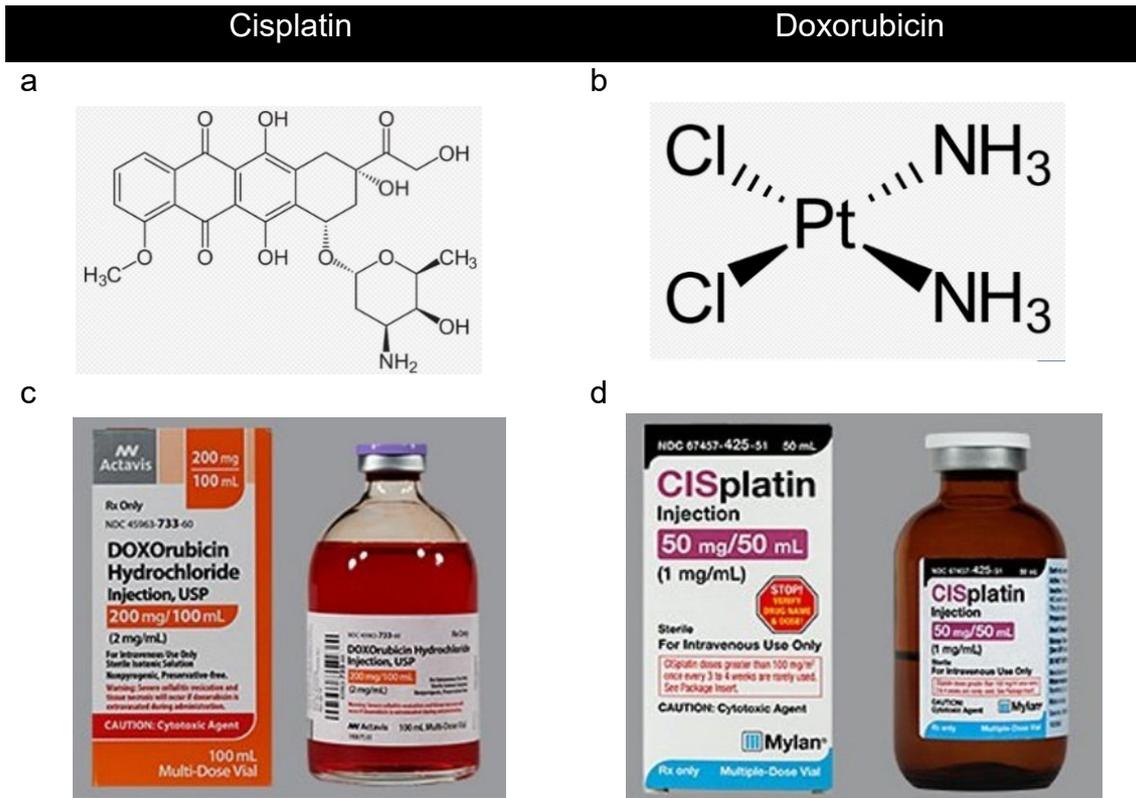


Abbildung 6: Studienmedikation

Molekulare Strukturformel von Cisplatin (a) und Doxorubicin (b), sowie angewandte Fertigarzneimittel (c und d).

Für CIS wurde bei den Versuchen eine Injektionslösung von 1 mg/ml (Cisplatin Teva®, TEVA GmbH, Ulm) verwendet: Die Dosis wurde analog zur klinischen Dosis am Universitätsklinikum Tübingen bei 7,5 mg/m² definiert. Die aerosolierte Lösung bestand also aus 2,7 mg DOX in einem Volumen von 50 ml NaCl 0,9% und 13,5 mg CIS in 150 ml NaCl 0,9%. (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019).

2.4.2 Doxorubicin

Das Anthrazyklin DOX ist eine der wirksamsten antineoplastischen Medikamente: Anthrazykline haben die Eigenschaft, sich in die DNA-Helix zu interkalieren und/oder kovalent an Proteine zu binden, die an der DNA-Replikation und Transkription beteiligt sind, was letztlich zum Zelltod führt (Carvalho et al. 2009). DOX wird aufgrund seiner Wirksamkeit bei der Bekämpfung einer Vielzahl von Krebsarten wie Karzinome, Sarkome und hämatologische Erkrankungen eingesetzt (Carvalho et al. 2009). DOX wird

entweder allein oder in Kombination eingesetzt (Struller et al. 2019; Carvalho et al. 2009). DOX kann nur durch passive Diffusion in Krebszellen eindringen (Carvalho et al. 2009), und hat eine geringe Eindringtiefe in das Gewebe. DOX hat aber dosisabhängige, schwerwiegende Nebenwirkungen und kann z.B. eine irreversible Kardiomyopathie verursachen, die zu jedem Zeitpunkt nach der Behandlung auftreten kann (Johnson-Arbor and Dubey 2017; Carvalho et al. 2009).

Bei den eIBUB-Versuchen wurde eine Injektionslösung von Doxorubicinhydrochlorid 2 mg/ml (cell pharm GmbH, DOXO-cell®, Bad Vilbel) verwendet. Die Dosis wurde analog zur klinischen Dosis am Universitätsklinikum Tübingen (1,5 mg Doxorubicin/m² Körperoberfläche) gewählt und in 50 ml NaCl 0.9% verdünnt (Castagna et al. 2021).

2.5 Medikamentenapplikation

Die Chemotherapielösungen wurden analog zur klinischen PIPAC im Rinderharnblasen-Modell über 5-7 min aerosolisiert. Zuerst wurde DOX, dann CIS verabreicht. Dann wurde das System für 30 min bei einem Druck von 12-15 mmHg unter kontinuierlicher Druckmessung und -ausgleich in der Homöostase gehalten. Das toxische Aerosol wurde über einen HEPA-Filter sicher entsorgt. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur (20-24°C) durchgeführt (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019).

2.6 Biopsien

Zur Testung der Studienhypothesen erfolgten Biopsie Entnahmen mit verschiedenen Durchmessern, sowie benetzte vs. nicht benetzte Proben entnommen.

- Im ersten Teil der Experimente wurden Proben mit verschiedenen Durchmessern (6 und 12 mm) verglichen, im Weiteren mit „ST6“ und „ST12“ benannt. Bei gleichbleibender Stanzentiefe wurde eine niedrigere Medikamentenkonzentration (ng Medikament/ mg Trockengewicht) in ST6 als in ST12 erwartet.

- Im zweiten Versuchsteil wurde die Medikamentenkonzentration im Gewebe vor und nach Abtupfen des oberflächigen Medikamentenfilmes gemessen. Es wurde erwartet, dass die gemessene Medikamentenkonzentration "im Gewebe" durch den oberflächigen Film erhöht wird.

Eine schematische Darstellung der experimentellen Vergleiche ist in der Abbildung 7 zu finden.

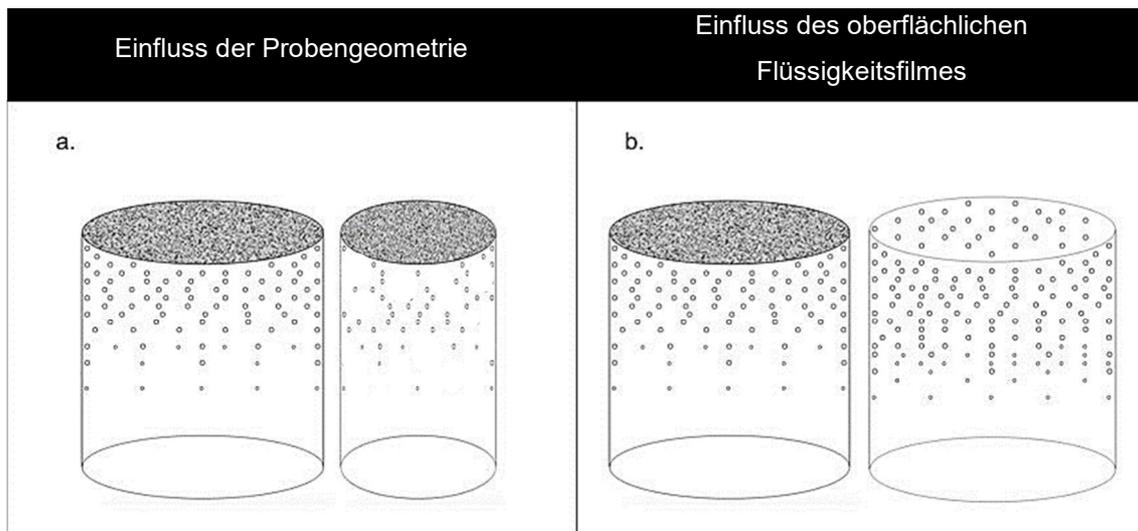


Abbildung 7: Schematische Darstellung der experimentellen Vergleiche

- (a) Es wurden Proben mit verschiedenen Durchmessern (6 und 12 mm) verglichen.
 (b) Im zweiten Versuchsteil wurde die Medikamentenkonzentration im Gewebe vor (links) und nach Abtupfen (rechts) des oberflächigen Medikamentenfilmes gemessen.

Nach der Exsufflation, dem Entfernen des Trokars und des Ableitungsschlauchs wurde die Rinderblase aufgeschnitten. Es stellte sich nun eine ovale Fläche dar, wobei sich die behandelte Innenseite (das Peritoneum) auf der Oberseite befand und die Außenseite der Blase (die Mukosa) auf ein Schneidebrett gelegt wurde. In jeder Blase wurden je 2x drei Stanzbiopsien (Biopsy punch, SMI, Steinerberg) von 6, resp. 12 mm Durchmesser im oberen, im mittleren und im unteren Bereich entnommen (Abbildung 8).

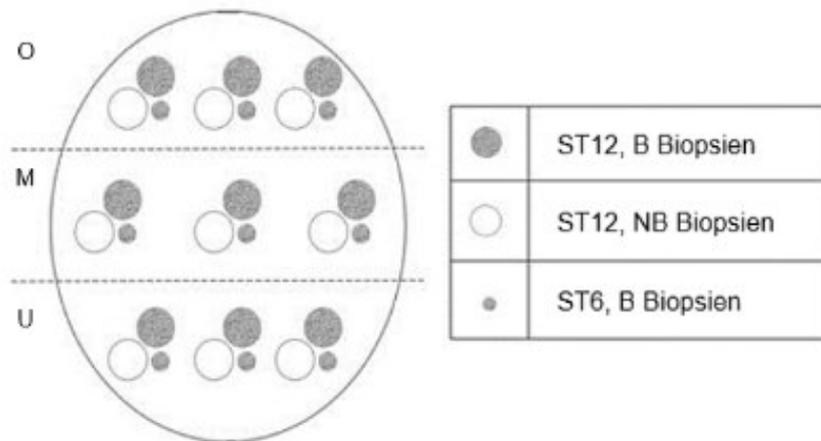


Abbildung 8: Probenentnahmeschema im Rinderharnblasen-Modell.

Es wurden insgesamt 27 transmurale Stanzbiopsien von verschiedenen Durchmessern (6 und 12 mm) in verschiedenen Lokalisationen entnommen. Unterteilung der Blasenoberfläche in drei anatomische Segmente: oben (O), mittig (M) und unten (U).

Jede Biopsie wurde senkrecht zur Oberfläche gestanzt, von der behandelten peritonealen Schicht durch die gesamte Tiefe der Harnblasenwand (4-6 mm) (Abbildung 9). Die gewonnenen zylindrischen Proben unterschieden sich also nur durch den variablen Durchmesser voneinander. Jedes Experiment wurde jeweils mit drei unterschiedlichen Rinderblasen wiederholt (Castagna et al. 2021).

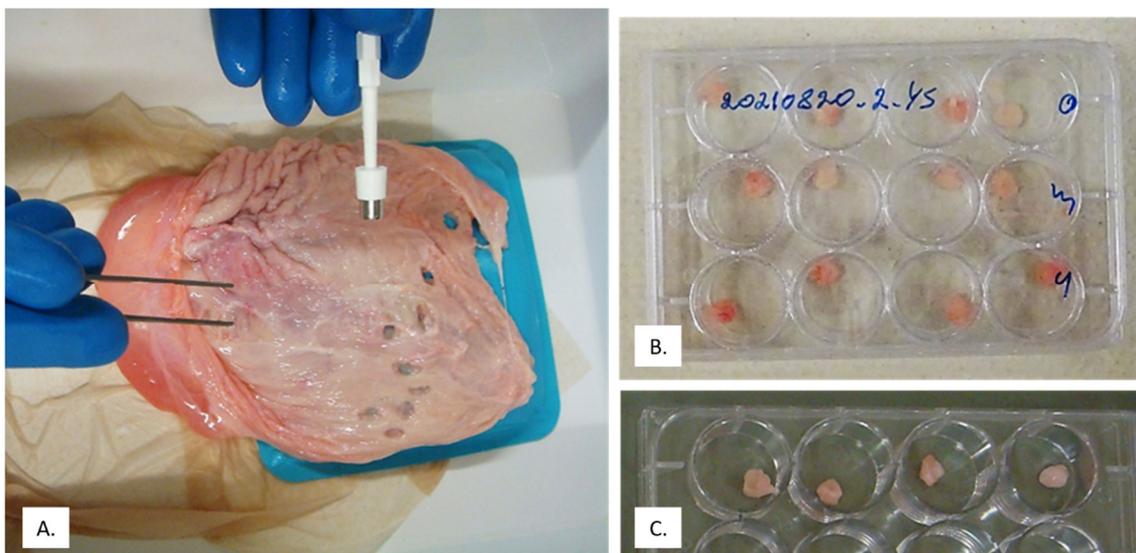


Abbildung 9: Entnahme von Proben aus der Rinderharnblase:

a) Biopsiestanzen mit Entnahme von transmuralen Proben aus der Harnblasenwand. b) Biopsien aus dem oberen (O), mittleren (M) und unteren (U) anatomischen Segment der Blase. c) Probenmorphologie.

Zur Berechnung der Oberfläche ist daher folgende Formel anzuwenden: $A = \pi r^2$. Angenommen, der Probendurchmesser beträgt 6 mm, dann ergibt sich daraus folgender Wert:

$$\begin{aligned} & \cdot \quad 6 \text{ mm} / 2 = 3 \text{ mm Radius } (r) \\ & \cdot \quad 3 \text{ mm} * 3 \text{ mm} * \pi = 28,3 \text{ mm}^2 \end{aligned}$$

Dieselbe Formel wird auch für die Berechnung der Oberfläche der Biopsien mit einem Durchmesser von 12 mm verwendet:

$$\begin{aligned} & \cdot \quad 12 \text{ mm} / 2 = 6 \text{ mm Radius } (r) \\ & \cdot \quad 6 \text{ mm} * 6 \text{ mm} * \pi = 113,0 \text{ mm}^2 \end{aligned}$$

Anschließend wurden die Oberflächen der Stanzbiopsien verglichen (ST12 vs. ST6):

$$113,0 \text{ mm}^2 / 28,3 \text{ mm}^2 = 4$$

Das Verhältnis zwischen den beiden Oberflächen entspricht dem Faktor 4. Da die Biopsien als zylindrische Volumen betrachtet werden können, unterscheiden sich die Volumina von ST6 und ST12 bei gleichbleibender Stanztiefe ebenfalls um den Faktor 4. Die verschiedenen Stanzbiopsien wurden innerhalb jedes Bereichs (im oberen, mittleren und unteren Segment der Harnblase) jeweils dreifach entnommen. So wurden für das erste Teilexperiment insgesamt 54 Biopsien analysiert.

Der Einfluss des oberflächlichen Flüssigkeitsfilms auf die CIS und DOX-Gewebekonzentration wurde durch Entnahme zusätzlicher Biopsien untersucht. Für die benetzte (B) und nicht benetzte (NB) Gruppe wurden 18 weitere Biopsien entnommen. Jeweils neun 12 mm Stanzbiopsien wurden von der Ober-, Mittel- und Unterseite jeder Rinderharnblase entnommen. Jede Gruppe (B und NB) bestand dabei aus 27 Biopsien. Für das zweite Teilexperiment wurden insgesamt 54 Biopsien entnommen.

Da die benetzten 12 mm Biopsien für beide Experimente angewendet wurden, ergaben sich insgesamt für beide Teilexperimente 81 (und nicht 108) Biopsien.

Vor der weiteren Aufarbeitung wurden alle 81 Biopsien in einer beschrifteten 12-well Mikrotiterplatte asserviert und bei -80 °C tiefgefroren (Castagna et al. 2021).

2.7 Präanalytische Probenvorbereitung

Die nächsten Vorbereitungsschritte bestanden im Gefriertrocknen und Wiegen der Proben. Dieses Verfahren ermöglicht die Berechnung der Medikamentenkonzentration durch Normalisierung der Auswertung auf 1 mg Trockengewicht. Alle Biopsien werden bei +4°C aufgetaut und anschließend im Vakuum lyophilisiert (Castagna et al. 2021).

2.7.1 Lyophilisierung der Biopsien

Für valide Messungen sollte das Gewebe zum Zeitpunkt der Entnahme und Analyse so genau wie möglich die ursprüngliche *in-vivo* Situation widerspiegeln (Kirwan et al. 2018). Metabolische Aktivitäten können im Gewebe oder in Körperflüssigkeiten auch nach der Entnahme weitergehen. So können sich die Konzentrationen der Medikamente und deren Metaboliten aufgrund laufender enzymatischer Aktivitäten, der Einwirkung von Sauerstoff, UV-Licht oder der Temperatur nach der Probenentnahme verändern (Kirwan et al. 2018).

Der Lyophilisierungsprozess beinhaltet aus drei Stufen: 1. Einfrieren; 2. Primärtrocknung und 3. Sekundärtrocknung (Abbildung 10).

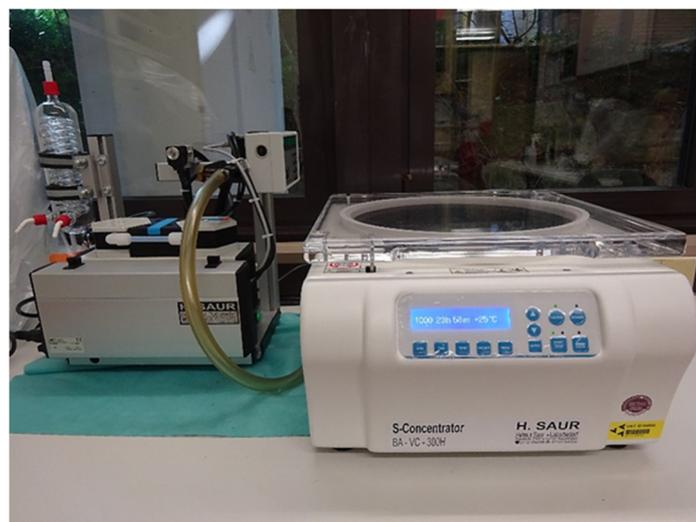


Abbildung 10: Lyophilisierungsanlage:

Die Proben wurden mit dem Bachofer Vacuum Concentrator, BA-VC-300H lyophilisiert.

Durch das Einfrieren wird Wasser in Eis umgewandelt und von gelösten Komponenten getrennt. In der ersten Trocknungsstufe wurde dann der Druck in der Kammer unter den Gleichgewichtsdampfdruck von Eis gesenkt. Die Raumtemperatur wurde schrittweise erhöht, wobei eine Wärmeübertragung von der Oberfläche des Materials erfolgte: dadurch wurde die Sublimation des Eises in den Eppendorf Gefäßen ausgelöst. Danach wurde der sublimierte Wasserdampf in den Kondensator geleitet und somit wieder in Eis verwandelt. Die Wärme, die dem Produkt als latente Sublimationswärme entzogen wurde, wurde dem Produkt wieder zugeführt. In der sekundären Trocknungsstufe war die Temperatur der Probe höher als in der Primärtrocknung: Es wurde zu Wasser, das während der Gefrierphase nicht in Eis verwandelt wurde und sich in den gelösten Komponenten als nicht gefrierendes Wasser eingeschlossen hatte. Es war dieser letzten Schritt, in dem eine Diffusion und Desorption des verbleibenden Wassers in der Probe stattfand (Kawasaki, Shimanouchi, and Kimura 2019).

Nach der Entnahme wurden die Gewebeproben bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Zu Beginn der Verarbeitung wurden die Biopsien bei Raumtemperatur (RT) unter einer Zytostatika Bank aufgetaut (Abbildung 11).



Abbildung 11: Gewebebiopsien vor und nach der Lyophilisierung:

- a) Die Proben wurden in 2 ml Eppendorf Röhrchen platziert; b) Die Proben wurden über Nacht im Vakuum lyophilisiert; c) Beispiel einer Probe nach der Lyophilisierung.

Die Biopsien wurden dann in beschriftete 2 ml Röhrchen überführt und vor der Gefriertrocknung bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wurden die Eppendorf Röhrchen in ein Speedvac-Gerät (Bachofer Vacuum Concentrator, BA-VC-300H, H. Saur, Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland) gestellt und über Nacht im Vakuum (1000 rpm; 100 mbar) bei RT zentrifugiert. Die getrockneten Proben wurden dann aus den Röhrchen entnommen und auf einer Präzisionswaage (R180D; Sartorius, Deutschland) für die spätere Gewichtsnormalisierung gewogen (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019; Toussaint et al. 2021).

2.7.2 Homogenisierung der Gewebeproben

Um pharmakologische Analysen in biologischen Gewebeproben zu ermöglichen, (Castagna et al. 2021; Smith and Xu 2012), muss ihre Gewebestruktur auf zellulärer Ebene aufgebrochen werden. Eine Homogenisierung durch manuelle, physikalische oder mechanische Maßnahmen sind dabei die gängigsten Verfahren zur Gewebehomogenisierung, gefolgt von enzymatischen Trennungen. Zu den mechanischen Methoden gehören Schneiden oder Hacken, Mahlen, Scheren, Mischen und Ultraschall Behandlung. (Smith and Xu 2012).

Jede der oben genannten Techniken kann bis zu einem gewissen Grad das Gewebe homogenisieren, aber auch alle Zellen zerstören. Bei dichteren Gewebeverhältnissen wie z.B. fibrotischem Gewebe, kann allein die Erhöhung der Antriebskraft oder der Expositionszeit das Ergebnis beeinflussen. Der Einsatz von Kraft ist begrenzt, denn durch Wärme und/oder Scherkräfte können Zielmoleküle zerstört werden. Außerdem beschleunigt eine übermäßige Kraft die Abnutzung des Gerätes (Goldberg 2008).

Zwei Methoden können zur Beschleunigung der Metall- oder Keramikkugeln angewendet werden: Schütteln des gesamten Behälters oder drehendes Rührwerk in einem Behälter. Die Methode des Schüttelns des Behälters in dem sich das Gewebe plus 3 bis 4 Kugeln befindet ist sowohl bei Gewebe als auch bei Zellen anwendbar. Für extrem kleine Proben von 0,2 ml bis zu etwas größeren Mengen von 50 ml ist das Schütteln des Gefäßes die Methode der Wahl. Die Bewegung kann je nach gewählter Ausrüstung mit unterschiedlicher

Kraft durchgeführt werden. Das Schütteln kann nur im Serienbetrieb erfolgen, wodurch die Menge der zu verarbeitenden Materialien begrenzt ist (Goldberg 2008) (Abbildung 12).

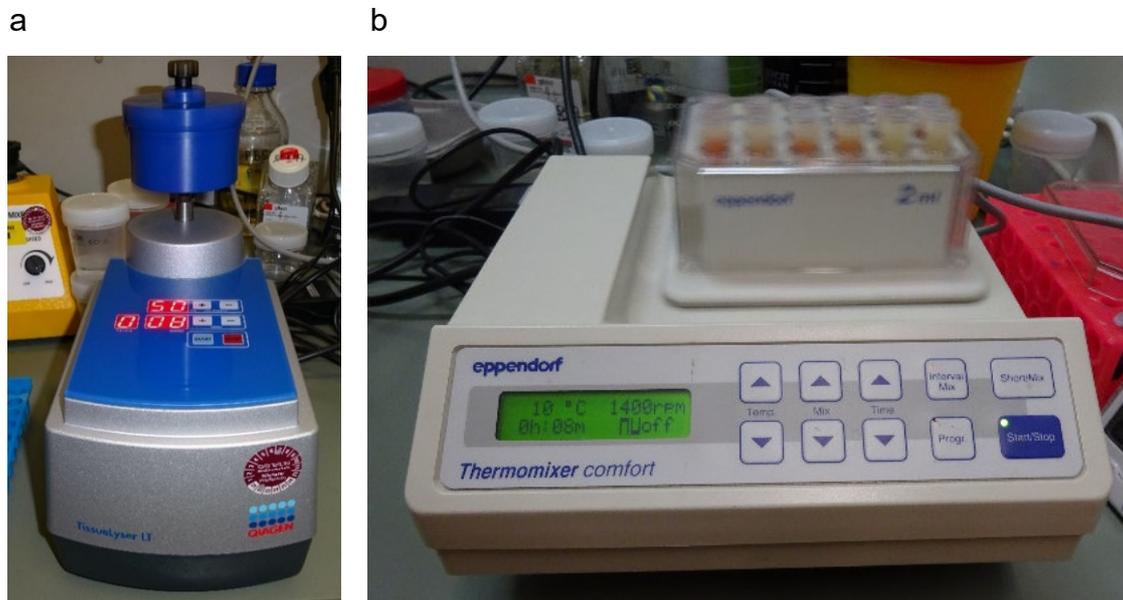


Abbildung 12: Homogenisierungsprozess:

Das Gewebe wurde durch die kontinuierliche Homogenisierung des Gewebes mittels Edelstahl- oder Keramikugeln ermöglicht. (a. TissueLyser LT; QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland); b) Dann wurden die Probenröhrchen für 10 Minuten bei RT zentrifugiert (Thermomixer 5417R, 9000 rpm; Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Bei der präanalytischen Homogenisierung der Peritonealbiopsien wurde ein TissueLyser LT (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) eingesetzt. Der TissueLyser ist eine kleine Perlmühle, die einen schnellen und effektiven Aufschluss von bis zu 12 Proben gleichzeitig ermöglicht. Das gleichzeitige Aufbrechen und Homogenisieren wird durch Hochgeschwindigkeitsschütteln der Proben in 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen mit Edelstahl- oder Keramikperlen erreicht.

Zu den trockenen Biopsiepellets inklusive vier Metallkugeln wurde 1,5 ml steriles destilliertes Wasser pipettiert (Ampuwa, Fresenius KABI, Homburg, Deutschland) und die Proben wurden über Nacht bei +4°C rehydriert (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019; Toussaint et al. 2021). Das Probenmaterial wurde zusammen mit den Metallkugeln in 2 ml Plastik Röhrchen (PowerBead Tubes Kit; Metall 2.38 mm; QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) überführt und anschließend in

vertikaler Position (50 Hz, 3000 Oszillationen/min) für 1 Stunde im TissueLyser LT bei RT geschüttelt (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019; Toussaint et al. 2021) (Abbildung 13).

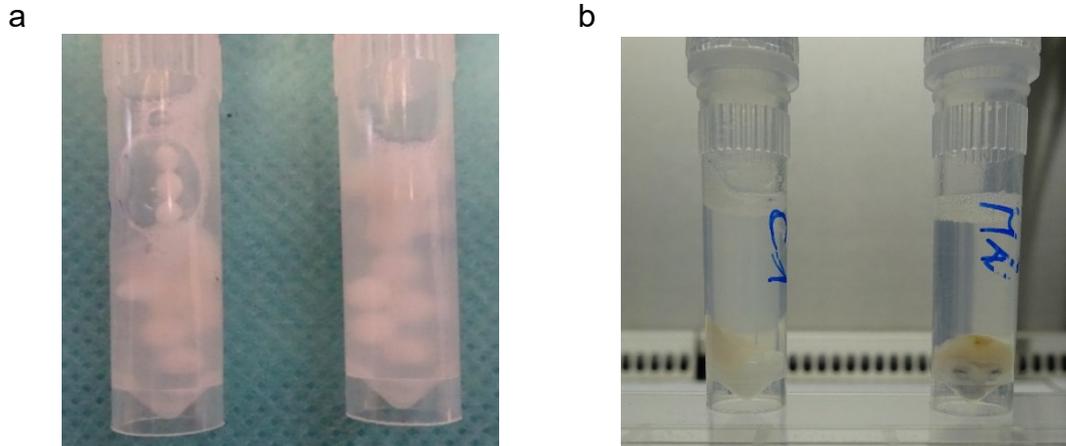


Abbildung 13: Probenhomogenisierung:
Peritoneale Gewebeproben a) während dem Homogenisierungsprozess und b) nach der Zentrifugation.

Zusätzlich wurden die Röhren eine Stunde lang in einem Vortex-Mixer in horizontaler Richtung gemischt. Am Ende wurden die Probenröhren für 10 Minuten bei RT zentrifugiert (Thermomixer 5417R, 9000 rpm; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und bei -80 °C gelagert.

2.8 Pharmakologische Messungen

Fast alle Medikamente (mit nur wenigen Ausnahmen wie Heparin) entfalten ihre Wirkung nicht im Plasmakompartiment, sondern im Zielgewebe, in das sich die Substanz aus dem zentralen Kompartiment verteilen muss (Eichler and Müller 1998). Das bedeutet, dass die pharmakologische Wirkung durch die Konzentration am Zielort bestimmt wird (Eichler and Müller 1998). Pharmakokinetische Studien haben gezeigt, dass die intraperitoneale Oberflächenpenetration von Arzneimitteln in Tumorgewebe äußerst begrenzt ist (Nadiradze et al. 2020; Castagna et al. 2020), so dass eine Optimierung der Verabreichung dringend erforderlich ist.

Platinpräparate (Cisplatin, Carboplatin, Oxaliplatin) sind eine der am häufigsten verwendeten antineoplastischen Wirkstoffe für die intraperitoneale Chemotherapie (Rossi et al. 2003). Vor allem CIS allein oder in Kombination mit DOX, wird vielfach eingesetzt. Die Gewebeanalyse und Rückverfolgung im Zielgewebe sind deshalb für die Optimierung der Therapien unerlässlich (Castagna et al. 2021).

Der Nachweis von CIS und DOX erfolgte in einem externen GLP-zertifizierten Labor (MVZ Dr. Eberhard & Partner Dortmund (ÜBAG), Dortmund, Deutschland). Die Röhrchen wurden nach Homogenisierung und Zentrifugation auf Trockeneis versandt: Um die Zuverlässigkeit der Studie zu gewährleisten, wurde die Probenidentität verblindet.

2.8.1 Doxorubicin

Die Stabilität der Anthrazykline wie DOX wird von vielen Faktoren beeinflusst, darunter die Lagertemperatur, der pH-Wert des Lösungsmittels und Licht (Wood, Irwin, and Scott 1990). Wood et al. weisen darauf hin, dass die Metabolisierung von Anthrazyklinen bei Konzentrationen im niedrigen Mikrogramm- und Nanogrammbereich sehr schnell sein kann, wenn die Lösungen ausreichend lange künstlichem Licht mit hoher Intensität oder Sonnenlicht ausgesetzt werden (Wood, Irwin, and Scott 1990).

Die Konzentration von DOX im Gewebe wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenz-Detektion quantitativ gemessen (Waters Fluoreszenzdetektor 2475; Waters Inc., Milford, MA). Die HPLC ist als empfindliche und selektive Methode für die Quantifizierung von DOX validiert (van Asperen, van Tellingen, and Beijnen 1998; Álvarez-Cedrón, Sayalero, and Lanao 1999).

Präanalytische Studien ergaben einen linearen Messbereich in der 5%igen Glukose-Matrix von 0,1 bis 10.000 µg/ml DOX und zeigten keine Beeinflussung durch die organischen Matrices (Toussaint et al. 2021). Die untere Sensitivitätsgrenze der Quantifizierung betrug 5 ng/ml (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019; Toussaint et al. 2021).

2.7.1 Cisplatin

CIS ist ein anorganischer Schwermetallkomplex. Aufgrund der ungenügenden Nachweisgrenzen mittels Flammen-Atom-Absorptions-Spektroskopie (FAAS) werden häufig Atomabsorptionsspektroskopie mit elektrothermischer Atomisierung (ETA-AAS) für die Bestimmung von Platin in niedrigen Konzentrationen verwendet (Farago and Parsons 1982). In unserer Arbeit wurde CIS durch Atomabsorptionsspektroskopie (ZEE nit P 650; Analytic Jena AG, Jena, Deutschland) quantifiziert. Die untere Sensitivitätsgrenze für Platin betrug 50 ng/ml. Die präanalytische Validierung ergab einen linearen Messbereich in einer 5%igen Glc-Matrix von 0,1 bis 100 µg/ml Platin und ergab keine Interferenzen durch organische Matrices (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019; Toussaint et al. 2021).

2.9 Statistische Evaluation

In dieser Arbeit wird die deskriptive Statistik für quantitative Daten als Mittelwert und Konfidenzintervalle 5-95% angegeben und grafisch mittels Boxplots dargestellt. Statistische Vergleiche zwischen den Gruppen wurden mit parametrischen (ANOVA) (St and Wold 1989) und nicht-parametrischen Tests (Mann and Whitney 1947) unter Verwendung der SPSS-Software v. 25 (IBM, Chicago, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Biopsiegeometrie auf die Medikamentenkonzentration im Gewebe

In einem ersten Experiment wurde die Gewebekonzentration von zwei Zytostatika (CIS und DOX) in standardisierten Peritonealbiopsien mit einem Durchmesser von 6 mm (ST6) und 12 mm (ST12) gemessen. Die Oberfläche der Proben entsprach 28,2 mm² (ST6) bzw. 113,0 mm² (ST12), mit derselben Tiefe, da es sich stets um transmurale Stanzbiopsien handelte. Es konnte ein Unterschied um den Faktor 4 im Verhältnis von Oberfläche zur Tiefe in den Proben ermittelt werden. Die jeweilige Gruppengröße (ST6 und ST12) für DOX und CIS betrug 54 Biopsien, bestehend aus drei Stanzen in je drei Lokalisationen (oben, mittig, unten) der eIBUB, also insgesamt 108 Biopsien (Castagna et al. 2021).

3.1.1 Doxorubicin

Nach dem Wiegen des Lyophilisats, zwecks Normalisierung auf 1 mg Trockengewicht, wurde die Konzentration von DOX mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion bestimmt. Die Konzentration von DOX im Gewebe betrug 0,46 ng/mg (CI 5-95%; 0,29 - 0,62) in der ST6 Gruppe vs. 0,43 ng/mg (CI 5-95%; 0,33 - 0,54) in der ST12 Gruppe ($p=0,25$). Die Verteilung der Werte in der ST6 Gruppe war breiter verglichen mit der ST12 Gruppe (Abbildung 14). Vermutlich waren die Messwerte in kleineren Proben ungenauer mit größerer Streuung. Weiterhin lagen 25% der Messwerte der ST6 Gruppe unterhalb der Sensitivitätsgrenze und wurden deshalb in den weiteren Berechnungen mit null ng/mg angegeben.

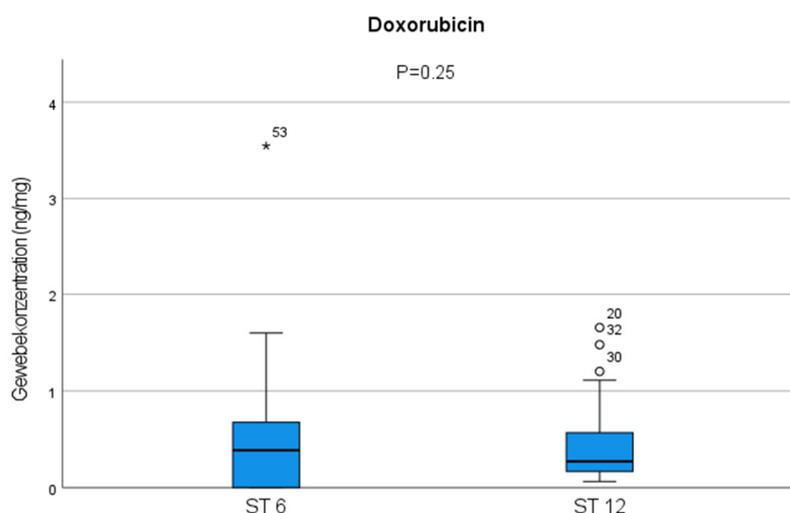


Abbildung 14: Gewebekonzentration von DOX in Abhängigkeit der Probengeometrie

Es wurde die Gewebekonzentration von DOX in Proben von 6 mm (ST6) vs. 12 mm (ST12) Durchmesser unter denselben experimentellen Bedingungen bestimmt. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, jedoch zeigte sich eine höhere Variabilität und mehr Messungen die unterhalb der Sensitivitätsgrenze lagen bei den kleineren Biopsien (ST6). Die DOX Konzentration wurde auf 1 mg Trockengewicht in beiden Gruppen normalisiert.

In der ST12 Gruppe zeigten die DOX Konzentrationswerte eine homogenere Verteilung. Hierbei lagen drei Werte aufgrund der biologischen Variabilität des Systems außerhalb der Kurve. Die Standardabweichung der ST6 Gruppe betrug hierbei 0,6 vs. 0,3 in der ST12 Gruppe. In der Kurve der ST12 Gruppe war jedes Quartal repräsentiert, dies bedeutet, dass alle Werte oberhalb der Messbarkeitsgrenze lagen. Eine statistische Signifikanz wurde nicht erreicht (P= 0,25) somit konnte zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied nachgewiesen werden.

3.1.2 Cisplatin

Auch für die CIS Werte wurden die Daten auf 1 mg des Trockengewichts normalisiert. Die mittlere Gewebekonzentration von CIS lag bei der ST6 Gruppe vs. der ST12 Gruppe signifikant höher (23,2 ng/mg; CI 95%; 20,3 –26,1 vs. 8,1 ng/mg; CI 95%; 7,2 –9,2). Die Datenstreuung war bei den ST12 Proben deutlich geringer als bei den ST6 Proben: Die Standardabweichung der ST6 Gruppe lag bei 10,6 vs. einem Wert von 3,6 bei der ST12 Gruppe (Abbildung 15).

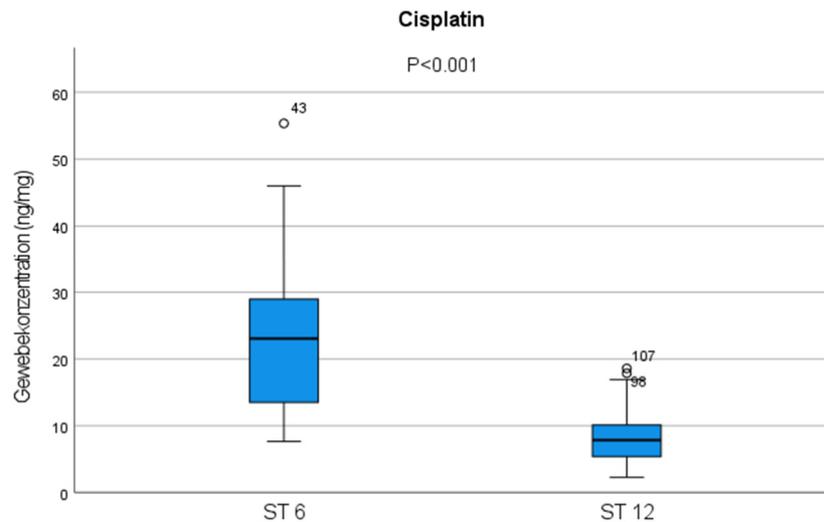


Abbildung 15: Gewebekonzentration von Cisplatin in Abhängigkeit der Probengeometrie

Gewebekonzentration von CIS in Proben von 6 mm (ST6) vs. 12 mm (ST12) Durchmesser unter denselben experimentellen Bedingungen. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Analyse der Konzentrationswerte in den mit CIS behandelten Proben zeigte, dass sich die gemessene CIS Konzentration zwischen den beiden Gruppen signifikant unterscheidet ($P=0,001$). Auch die Streuung der CIS-Konzentrationsdaten war geringer bei den Proben mit dem größeren Durchmesser.

3.2 Einfluss der Gewebetrocknung auf die Konzentration

Die Aerosolisierung einer Lösung hinterlässt einen Flüssigkeitsfilm auf der peritonealen Oberfläche. Deswegen wurde der Einfluss des Lösungsfilms auf die Medikamentenkonzentration im Gewebe untersucht. Die Proben wurden in zwei Gruppen (nicht-benetzte (NB) vs. benetzte (B) Proben) aufgeteilt. In der NB-Gruppe befanden sich alle Biopsien, bei denen die überschüssige Zytostatikallösung durch Abtupfen entfernt wurde. Die B Gruppe bestand aus alle Stanzbiopsien bei denen der Flüssigkeitsfilm noch vorhanden war. In diesem Experiment bestand jede Gruppe B und NB jeweils für DOX und CIS aus 27 Biopsien (3 Stenzen pro Lokalisation innerhalb der Rinderharnblase – oben,

Mitte, unten: dies wurde dreifach wiederholt (n=3)). Ebenso wurden die Proben der Gruppen ST6 und ST12 miteingeschlossen.

3.2.1 Doxorubicin

Nach der Normalisierung und Auswertung auf 1 mg Tockengewicht zeigten die Gewebekonzentrationen von DOX eine höhere Standardabweichung in der B Gruppe. In dieser Gruppe befanden sich keine der Messungen unterhalb der Detektionssgrenze. In der NB Proben Gruppe waren 25% der Messungen unterhalb der Sensitivitätsgrenze von 0,5 ng/ml und wurden somit mit 0 ng/ml bewertet (Abbildung 16).

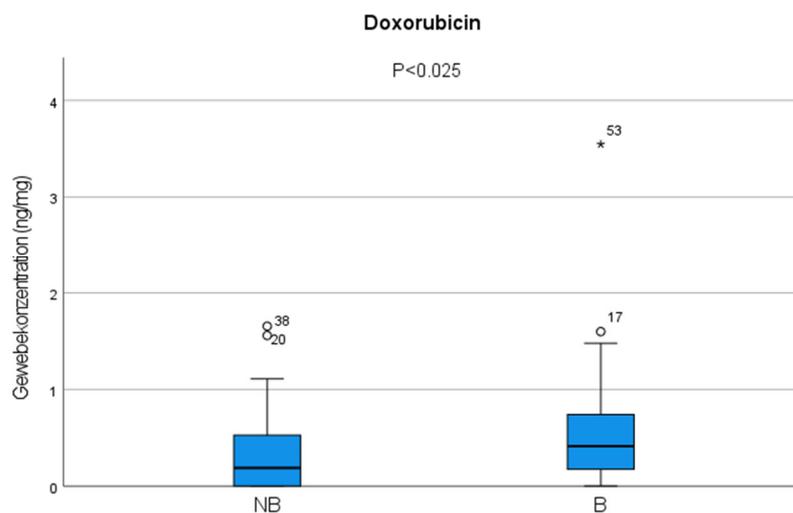


Abbildung 16: Gewebekonzentration von DOX in nicht-benetzten Proben (NB) vs. benetzten Proben (B)

Abtupfen der Gewebeoberfläche NB Gruppe vs. nicht abgetrockneten Proben B.

Ein signifikanter Unterschied in der Gewebekonzentration von DOX zeigte sich zwischen der NB Gruppe mit einem Mittelwert von 0,28 ng/mg (CI 95% 0,12-0,43) vs. der B Gruppe (0,64 ng/mg (CI 95% 0,35 –0,93), $p=0,025$).

3.2.2 Cisplatin

Die Gewebekonzentration von CIS zeigte, im Gegenteil zur DOX Konzentration, keinen signifikanten Unterschied ($p=0.75$) zwischen den beiden Gruppen (mit jeweils 23,5 ng/mg (CI 95%: 19,0-28,0) für die NB Gruppe und 22,9 ng/mg (CI 95%: 18,9-26,9) in der B Gruppe (Abbildung 17).

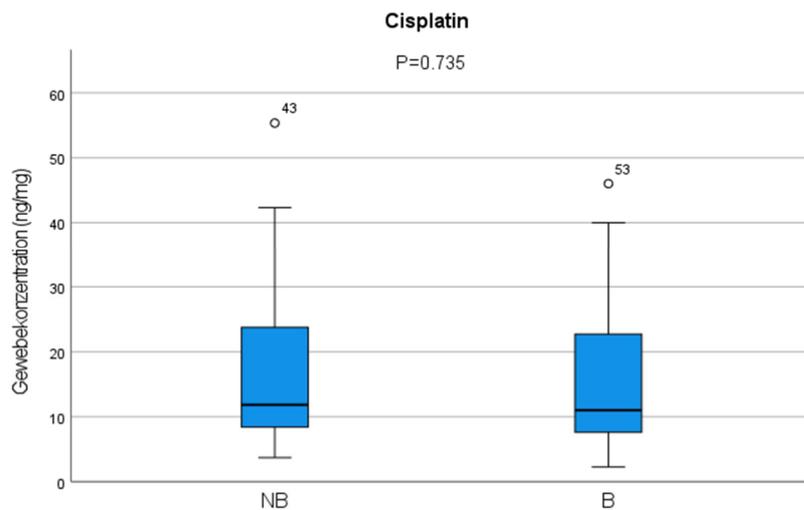


Abbildung 17: Gewebekonzentration von CIS in nicht-benetzten Proben (NB) vs. benetzten Proben (B)

Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Proben der B Gruppe vs. der NB Gruppe.

Die Datenstreuung war in den beiden Gruppen äquivalent mit einer Standardabweichung von 10,1 in der NB Gruppe und 11,3 in der B Gruppe.

3.3 Variabilität der Konzentrationsmessungen

Um die Belastbarkeit der Ergebnisse zu prüfen, wurde die Variabilität der Konzentrationsmessungen innerhalb der Blasen und zwischen den Blasen verglichen. Die Analyse der Variabilität der Konzentrationsmessungen erfolgte durch den Vergleich der Konzentrationswerte zwischen den oberen, mittleren und unteren Bereichen innerhalb der Harnblasen. Weiterhin wurden die Ergebnisse der Konzentrationsmessungen zwischen den Harnblasen verglichen.

Für diese Vergleiche wurden sämtliche verfügbare Biopsien einbezogen. Dazu zählten die drei Stenzen pro Lokalisation, die ST6 Biopsien und ST12 Biopsien jeweils vor und nach Entfernung des Flüssigkeitsfilms. So standen für die Vergleiche innerhalb und zwischen den Harnblasen 3 x 36 Biopsien zur Verfügung, die auf CIS- und DOX-Konzentrationen untersucht wurden.

Die Konzentrationsdaten der Variablen „Geometrie der Proben“ und „Vorhandensein eines Flüssigkeitsfilms an der Probenoberfläche“ waren normal

verteilt. Daher konnte eine Prüfung auf Signifikanz mit ANOVA durchgeführt werden.

3.3.1 Variabilität der Konzentrationsmessungen innerhalb der Harnblasen

Es zeigte sich kein statistisch relevanter Unterschied zwischen Gewebekonzentrationen von CIS und DOX in den Stanzbiopsien aus den drei anatomischen Bereichen innerhalb der Rinderharnblase (Abbildung 18).

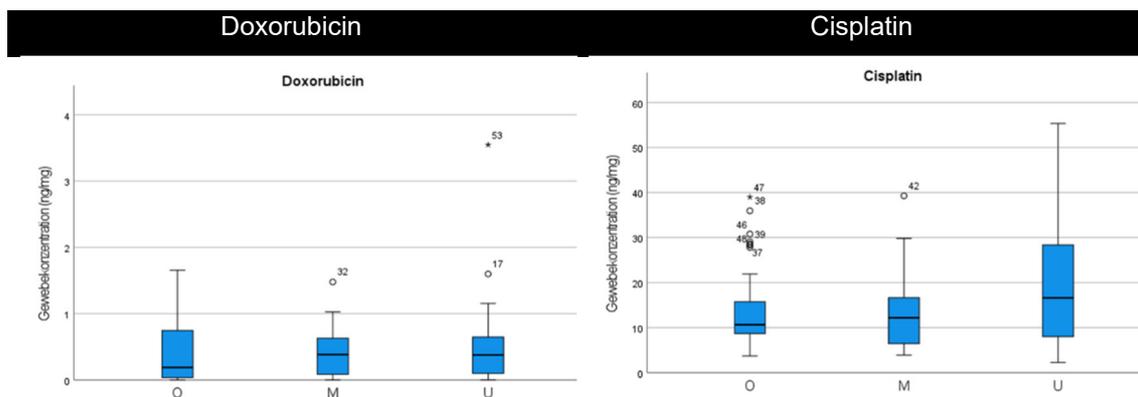


Abbildung 18: Variabilität der Konzentrationsmessung innerhalb der Rinderharnblasen
 Gewebekonzentration für DOX (links) und CIS (rechts). O: oberer Blasenbereich; M: mittlerer Blasenbereich U: unterer Blasenbereich.

Die Konzentrationsmessungen von CIS und DOX waren in den verschiedenen Bereichen der Blasen weitgehend vergleichbar. Die Mittelwerte der CIS-Konzentrationen in den Stanzbiopsien betragen im oberen und mittleren Bereich 13,4 ng/mg und 14,0 ng/mg. Die höchste Gewebekonzentration wurde mit 19,5 ng/mg im unteren Bereich erreicht. Es konnte aber kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen in den verschiedenen Lokalisationen nachgewiesen werden. Die Variabilität der CIS- Gewebekonzentrationswerte nahm allerdings vom oberen zum unteren Segment der Blasen zu. Bei ähnlichen Medianwerten war der sog. Interquartile Range (IQR) deutlich größer im unteren Bereich. Die Standardabweichung betrug jeweils 9,5 und 8,5 im oberen und mittleren Bereich, gegenüber 13,3 im unteren Bereich.

3.3.2 Vergleich der Konzentrationsmessungen zwischen den verschiedenen Harnblasen

Die Gewebekonzentrationswerte zeigten in der 1. Blase eine stärkere Varianz im Vergleich zur 3. Blase. Dabei befanden sich 25% der Ergebnisse unterhalb der Sensitivitätsgrenze von 5 ng/ml und wurden deshalb mit 0 ng/ml bewertet. Die Mittelwerte der DOX Konzentrationen betrug in der 1. Blase 0,56 ng/mg gegenüber nur 0,18 ng/mg in der 3. Blase. Eine statistische Signifikanz zwischen den Experimenten konnte nicht nachgewiesen werden und die Ergebnisse waren reproduzierbar (Abbildung 19).

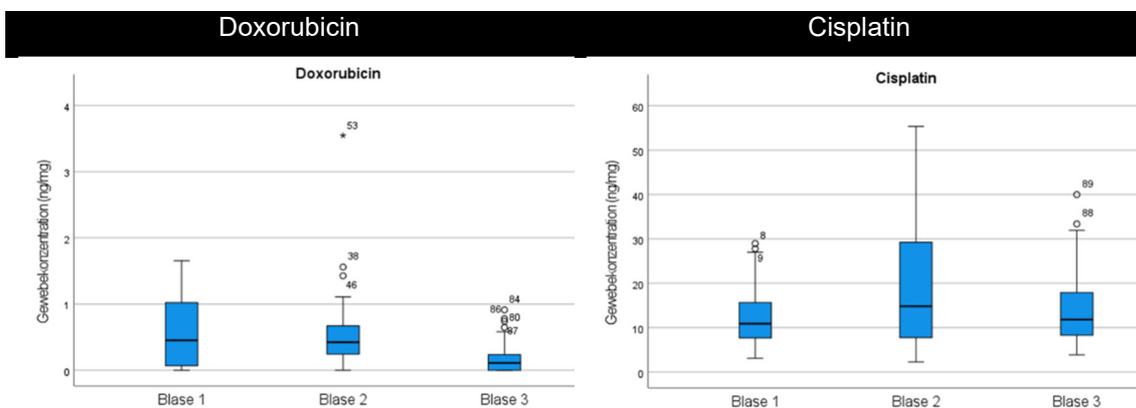


Abbildung 19: Vergleich der Konzentrationsmessungen von DOX und CIS zwischen den verschiedenen Rinderharnblasen

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den DOX- und CIS-Konzentrationswerten in den verschiedenen Blasen. Die Variabilität der CIS-Messungen war grösser in der Blase 2. Die DOX-Konzentrationswerte waren niedriger in der Blase 3.

Die CIS Gewebekonzentration der ersten drei Rinderharnblase- Experimente zeigten eine ähnliche Homogenität der Datenverteilung. Die Standardabweichung in der 1. Blase betrug dabei 6,8, in der 2. Blase 14,4 und in der 3. Blase 9,2. In diesem Experiment konnten alle Messungen in die statistische Berechnung miteinbezogen werden. Die Mittelwerte der CIS Konzentrationen betragen dabei in der 1. Blase 12,5 ng/mg, in der 2. Blase 19,7 ng/mg und in der 3. Blase 14,8 ng/mg. Eine statistische Signifikanz zwischen den Werten der Blasen 1, 2 und 3 konnte nicht nachgewiesen werden.

4 Diskussion

4.1 Intraperitoneale Chemotherapie

Die intraperitoneale Chemotherapie wird seit Jahrzehnten experimentell und klinisch untersucht (de Bree et al. 2017). Ein Vorteil der intraperitonealen Chemotherapie ist die hohe regionale Dosisintensität, die das Problem der relativen Medikamentenresistenz zum Teil überwinden und somit eine höhere Wirksamkeit lokal nach sich ziehen kann (Nadiradze et al. 2020).

Die meisten Daten zur Arzneimittelkonzentration im Peritoneum bzw. Abdomen liegen nach HIPEC vor: die dabei erreichte Eindringtiefe von intraperitoneal verabreichten Zytostatika ist marginal (de Bree et al. 2017). Damit ein Medikament gegen Krebs wirksam sein kann, muss im betroffenen Gewebe bzw. im Tumor eine zytotoxische Konzentration erreicht werden. Daher ist eine höhere Medikamentendosis sinnlos, wenn die Substanz nicht effektiv in den Tumor aufgenommen wird.

Die erfolgreiche Behandlung eines peritonealen Tumorbefalls erfordert ein multimodales Konzept. Diese beinhaltet eine systemische Chemotherapie, eine aggressive Resektion befallener intraabdomineller Organe und eine Peritonektomie, gefolgt von perioperativer lokaler Zytostatika-Applikation (Sugarbaker 2016). Die Zytostatika werden entweder in der frühen postoperativen Phase (wie bei der frühen postoperativen intraperitonealen Chemotherapie (EPIC)) appliziert, oder intraoperativ nach Durchführung der CRS in Form einer normothermen oder hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (NIPEC und HIPEC) verabreicht (Goodman et al. 2016). Die Kombination von CRS und HIPEC bleibt bis heute die einzig wirksame therapeutische Strategie um die peritoneale Metastasierung zu behandeln (Glehen et al. 2004; Roviello et al. 2013). Entscheidend für die Prognose ist die vollständige Resektion aller sichtbaren Tumorknoten. Daher ist die Auswahl der Patienten von zentraler Bedeutung. Patienten, die am meisten von einer CRS profitieren, haben eine begrenzte intraperitoneale Ausbreitung des Tumors und keine systemischen Metastasen, so dass eine vollständige Zytoreduktion

erfolgen kann. Mit der Entfernung aller sichtbaren peritonealen Tumore ist das Langzeitüberleben signifikativ verlängert (Sugarbaker 2016). Nicht zu vermeiden ist jedoch eine ungewollte intraoperative Kontamination mit Tumorzellen durch die Operation: Die im Anschluss verabreichte lokale Chemotherapie sorgt für die Eliminierung freier Mikrometastasen und verhindert die Ansiedlung von Tumorzellen, welche zu Rezidiven führen können (Glehen, Gilly, Boutitie, et al. 2010; Elias et al. 2010; Leebmann and Piso 2019). Eine Erhöhung der Temperatur der Zytostatikalösung auf 40,5 - 43°C fördert die gezielte Apoptose der Tumorzellen durch die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation und des Zellstoffwechsels. Zusätzlich wird die Eindringtiefe der Zytostatikalösung in die peripheren Tumorregionen erhöht (Sugarbaker, Van der Speeten, and Stuart 2010; Leebmann and Piso 2019; Urano 1999; Sugarbaker 2016).

Bei einer zu starken Ausbreitung der peritonealen Metastasierung (PCI > 17) ist die Durchführung einer CRS nicht mehr sinnvoll (Harmon and Sugarbaker 2005) und es wird eine systemische Chemotherapie verabreicht. Eines anderen Ansatzes bei nicht radikal operablen Patienten bedient sich die bisher nur wenig untersuchte PIPAC Technologie. Die intraperitoneale Verabreichung der Zytostatika erfolgt im Rahmen einer Laparoskopie wobei die PIPAC auch in mehreren Zyklen wiederholt werden kann. Die vorteilhaften pharmakologischen Eigenschaften der PIPAC wurden in präklinischen Modellen (Davigo et al. 2020; Khosrawipour, Khosrawipour, Diaz-Carballo, et al. 2016; Eveno et al. 2017; Toussaint et al. 2021) sowie in klinischen Veröffentlichungen mehrfach beschrieben (Tempfer, Giger-Pabst, et al. 2018; Solaß et al. 2012; Nowacki et al. 2018). Obwohl es inzwischen belegt ist, dass die derzeitige PIPAC Technologie höhere Konzentrationen von Zytostatika im Zielgewebe erreicht, sind auch Einschränkungen bei der Homogenität der räumlichen Verteilung des Aerosols beschrieben worden (Khosrawipour, Khosrawipour, Diaz-Carballo, et al. 2016). Die Größe der Tumore und die Adhäsionen, die sich durch die wiederholten PIPAC Zyklen in der Peritonealhöhle bilden, verhindern eine optimale und gleichmäßige Wirkung der Zytostatika und können letztendlich zum Versagen der Therapie führen. Gleichwohl wird in der Literatur eine signifikante Lebensverlängerung sowie die Erhaltung einer guten Lebensqualität beschrieben

(Horvath et al. 2018; Nadiradze et al. 2016; Gockel et al. 2018; Odendahl et al. 2015).

Aktuell werden klinische Studien bezüglich des Stellenwertes der PIPAC als Adjuvante bzw. prophylaktische Therapie durchgeführt (Goetze et al. 2018; Graversen et al. 2018).

4.2 Präanalytik der Biopsien

Pharmakologische Untersuchungen zur Gewebekonzentration nach intraperitonealer Chemotherapie zeigen eine erhebliche Variabilität (Toussaint et al. 2021; de Bree et al. 2017), wobei dies erklärbar ist, da die Biopsiengeometrie und die präanalytische Verarbeitung nicht standardisiert sind. Im Vergleich zu flüssigen Medien sind pharmakologische Analysen in Geweben eine wahre Herausforderung, und hängen von diversen Faktoren ab: Entnahme der Gewebeproben, Vorbereitung der Biomaterialien, Extraktion aus dem homogenisierten Gewebe und Stabilität bzw. Auffindung der Substanzen (Xue et al. 2012).

Unseres Wissens gibt es bis dato keine Studien über den Einfluss der Biopsiegeometrie und der Präanalytik von Pharmaka im Peritonealgewebe. Die bisher publizierten Gewebekonzentrationen sollten deshalb abhängig von der Proben Aufarbeitungsmethode reinterpreted werden (Castagna et al. 2021).

Unsere Ergebnisse belegen, dass je nach Probenaufarbeitung Unterschiede in der Medikamenten Konzentration im Peritonealgewebe auftreten. Dabei spielt die Geometrie der Biopsie oder ein an der Peritonealoberfläche verbleibender Medikamentenfilm eine entscheidende Rolle (Castagna et al. 2021).

Die Gewebeentnahme im Rinderharnblasen-Modell erfolgte mit standardisierten Stanzbiopsien unter reproduzierbaren Bedingungen. Im Gegensatz zum *ex-vivo* IBUB Modell sind *in-vivo* gewonnene Biopsien schwer zu standardisieren. Die Größe oder die Geometrie des entnommenen Gewebes *in-vivo* ist also nicht standardisiert und deswegen zeigen diese Studien eine erhebliche Variabilität in den Ergebnissen.

Weitere Variabilitätsfaktoren bei *in-vivo* Untersuchungen sind die anatomische Lokalisation der Biopsie und der Schweregrad der Peritonealerkrankung. Am Menschen gewonnene Peritonealbiopsien, sowie *in-vivo* Biopsien aus Tiermodellen, können von jedem Bereich des Abdomens entnommen werden. Es ist aber bekannt, dass das parietale und das viszerale Peritoneum ein unterschiedliches Aufnahmevermögen zeigen (Jacquet and Sugarbaker 1996a). Auch sind bei unterschiedlichen Patienten unterschiedliche Tumorhistologien (z.B. muzinöse vs. nicht-muzinöse Tumore), Grad der Fibrose, vorhanden, die einen erheblichen Einfluss auf die Medikamentenaufnahme in das Gewebe implizieren. Alle diese Faktoren unterstreichen den Bedarf eines standardisierten, reproduzierbaren *ex-vivo* Modells zur Optimierung der intraperitonealen Chemotherapieverfahren.

4.3 Einsatz eines *ex-vivo* Rinderblasen-Modells

Für diese Studie wurde ein in unserem Labor etabliertes *ex-vivo* Modell der Peritonealhöhle, das Rinderharnblasen-Modell, verwendet (Castagna et al. 2021; Sautkin et al. 2019), welches geeignet ist, die intraperitonealen Bedingungen zu simulieren und die Medikamenteneindringtiefe und Konzentration zu messen sowie zu manipulieren. Das Rinderharnblasen-Modell schließt die oben aufgelisteten Variabilitätsursachen anderer Modelle weitgehend aus. Außerdem ermöglicht das Rinderharnblasen-Modell eine bisher nicht erreichbare Genauigkeit, indem Konzentrationsgradienten innerhalb des Organs erfasst werden können (Castagna et al. 2021).

Das Modell erlaubt desweiteren eine wiederholte Durchführung der Experimente und somit einen Vergleich identischer Versuche mit unterschiedlichen Blasen. Aufgrund ähnlicher Größe der Rinderharnblase mit dem menschlichen Abdomen sind die gewonnenen Ergebnisse extrapolierbar.

In dieser Studie wurden Unterschiede in der Gewebekonzentration in Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen der Oberfläche und der Tiefe der Biopsie evaluiert. Für diesen Zweck wurden Stanzbiopsien verschiedener Durchmesser verglichen. Unsere Hypothese war, dass bei gleichbleibender Stanztiefe, sich

eine niedrigere Medikamentenkonzentration in kleineren als in größeren Biopsien findet. Experimentell konnten wir zeigen, dass je nach Morphologie unterschiedliche Gewebekonzentrationen vorlagen und je nach Medikament auch variierten. So war die gemessene Gewebekonzentration von CIS in den kleineren Biopsien (ST6) fast dreifach höher als in den größeren Biopsien (ST12), der Unterschied war statistisch signifikant. Dieses Ergebnis ist überraschend, da es widersprüchlich zu unserer Hypothese ist aber trotzdem in den einzelnen Rinderharnblasen und den verschiedenen Lokalisationen reproduzierbar war. Hingegen scheint die unterschiedliche Größe der Stanzbiopsien keine relevantere Rolle für die DOX-Gewebekonzentration zu spielen. Dieser Unterschied der CIS und DOX Gewebekonzentration zwischen verschiedenen Stanzendurchmessern kann vielleicht dadurch erklärt werden, dass DOX eine deutliche geringere Eindringtiefe in das Gewebe im Vergleich zu CIS hat (de Bree et al. 2017).

4.4 Einfluss unterschiedlicher Parameter auf die Biopsie-Entnahme

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss des Abtupfens des Medikamentenfilms auf die gemessene Gewebekonzentration untersucht. Wir hatten postuliert, dass durch das Abtupfen des Flüssigkeitsfilms von der Biopsieoberfläche eine geringere Konzentration gemessen werden kann. Diese Hypothese konnte experimentell für DOX, aber nicht für CIS bestätigt werden. Dieser Unterschied lässt sich vermutlich durch die geringere Aufnahme von DOX (höheres Molekulargewicht) vs. CIS (niedrigeres Molekulargewicht) in die Blasenwand erklären. Wahrscheinlich hat sich zu diesem Zeitpunkt kaum noch Cisplatin auf der Biopsieoberfläche befunden (Castagna et al. 2021).

Diese z.T. unerwarteten Ergebnisse konnten an verschiedenen Lokalisationen innerhalb der eIBUBs und in den unterschiedlichen Blasen reproduziert werden. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Konzentrationsmessungen zwischen den verschiedenen Blasenmodellen. Die Gewebekonzentrationen von CIS und DOX waren im unteren Bereich der Blasen

geringfügig erhöht. Dieser Konzentrationsgradient ist aber nach PIPAC Behandlung bekannt.

Die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb und zwischen den Blasen bestätigt die hohe Effektivität des Rinderharnblasen-Modells und schließt somit einen methodologischen Fehler weitgehend aus. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind belastbar. Relevant erscheinen vor allem die pharmakologischen Unterschiede, die zwischen den Zytostatika vorlagen. Ein gewisser Restunterschied zwischen den einzelnen Blasen kann dennoch, wie in allen biologischen Modellen, nicht ausgeschlossen werden.

Unsere Ergebnisse sind ein klarer Beleg dafür, dass die Technik der Biopsieentnahme und der präanalytischen Probenvorbereitung gerade in experimentellen Untersuchungen zur Pharmakodynamik standardisiert werden müssen. Dafür bieten sich Stanzen an, die für die Anwendung in der Dermatologie zugelassen sind und eine einheitliche Größe der Biopsien aufweisen (8 oder 12 mm). Durch erweiterte Analysen könnten standardisierte Auswertungs-Skalen erarbeitet werden, welche die Umrechnung der Gewebekonzentration aus unterschiedlichen Größen der Stanzbiopsien für unterschiedliche Arzneimittel zulassen würden (Castagna et al. 2021).

Diese Studie zeigt, dass die DOX-Gewebekonzentration bei Stanzbiopsien von 6 mm Durchmesser häufig unter der Sensitivitätsgrenze lag. So sind negative pharmakologische Messungen bei Biopsien kleiner als 6-8 mm zu erwarten, und ein Nachweis der DOX Gewebekonzentration in laparoskopischen Standardbiopsien wäre verfälscht. Die laparoskopischen Biopsie-Instrumente sind dafür konzipiert, dass die Größe des Präparates für pathologische Untersuchungen, aber nicht für pharmakologische Analyse ausreicht. Zur Beurteilung des Therapieerfolges mittels des PRGS Score werden vor allem bei wiederholten PIPAC Zyklen Biopsien von 3 bis 5 mm empfohlen, also kleiner als 6 mm (Solass et al. 2016). Pharmakologische Messungen aus Peritonealbiopsien am Menschen, die mit laparoskopischen Biopsiezangen entnommen wurden, sollten deswegen kritisch gesehen werden (Castagna et al. 2021).

Eine weitere Schlussfolgerung aus dieser methodologischen Studie ist, dass die Gewebeentnahme mittels der Stanzen senkrecht zur Oberfläche erfolgt. Bei der Durchführung einer PIPAC werden standardgemäß zwei Trokare gesetzt, wobei ein Zugang für die Kamera und ein Zugang für die laparoskopischen Instrumente gebraucht wird. Der Zugangswinkel erlaubt allerdings keine Entnahme senkrechter Biopsien in allen Quadranten. Dazu wären spezielle, flexible Instrumente notwendig, die aktuell nicht verfügbar sind. Durch das Setzen von zusätzlichen Zugängen könnte dieses Problem auch nur marginal adressiert werden (Castagna et al. 2021).

Weitere Faktoren haben Einfluss auf die Medikamentenkonzentration im Gewebe, wie z.B. der zeitliche Abstand zwischen der Probeentnahme und der Analyse sowie die Metabolisierung der Zytostatika im Gewebe. Dies ist bislang vielfach unberücksichtigt geblieben (Castagna et al. 2021).

Die Probengeometrie und das Abtupfen der Biopsieoberfläche haben somit unterschiedliche Auswirkungen auf die gemessene Gewebekonzentration von CIS, ein Molekül mit guter Gewebeaufnahme, vs. DOX, das nur bedingt im Gewebe aufgenommen wird. Der Vergleich der Gewebekonzentration von CIS und DOX bestätigt die heterogene Gewebeaufnahme. CIS weist, wie erwartet, eine allgemein höhere Konzentration im Gewebe auf. Die Technik der Biopsieentnahme und der präanalytischen Probenvorbereitung bei der Erforschung neuer lokaler Therapieverfahren und Formulierungen bei Peritonealmetastasen muss deshalb standardisiert werden.

4.5 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden Faktoren analysiert, die in der präanalytischen Probenentnahme und -aufarbeitung einen signifikanten Einfluss auf die Arzneimittelkonzentration im untersuchten Gewebe haben können. Es zeigte sich, dass die Geometrie der Biopsien relevant für die Medikamentenkonzentration im Gewebe hat. Da präanalytische Unterschiede bis zu einem Faktor 4 in den pharmakologischen Ergebnissen vorliegen können, müssen diese Faktoren in Folgeexperimenten berücksichtigt werden.

Zum Beispiel fand sich ein statistisch relevanter Unterschied in der gemessenen Gewebekonzentration von CIS, wenn Biopsien in unterschiedlichen Größen entnommen wurden. Dies erfordert eine möglichst genaue Standardisierung aller Experimente. Dieses Ziel kann z.B. durch die Anwendung von Stanzen mit einheitlichem Durchmesser erreicht werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten außerdem, dass die verbleibenden Zytostatika auf der Probenoberfläche die Medikamentenkonzentration im Gewebe beeinflusst. Es wird deswegen empfohlen, grundsätzlich die Oberfläche abzutupfen.

Schlussendlich zeigte diese Studie, dass die Probengeometrie und die präanalytische Probenvorbereitung einen relevanten Einfluss auf das Ergebnis haben. So sammelt sich DOX, ein größeres Molekül mit geringer Gewebepenetrationstiefe, in den oberflächigen Gewebeschichten, hingegen erreicht Platinum tiefere Gewebeschichten mit homogenerer Verteilung.

Somit erscheinen uns reproduzierbare Stanzbiopsien mit einheitlichem Durchmesser sowie das präanalytische Abtupfen der untersuchten Peritonealoberfläche relevant für weitere pharmakodynamische Studien.

5 Zusammenfassung

Die peritoneale Metastasierung bleibt eine Herausforderung in der modernen Onkologie, lokoregionale Verfahren wie die CRS und HIPEC sowie die PIPAC wurden entwickelt, um die Tumorlast zu reduzieren und die Wirksamkeit von Zytostatika im Zielgewebe zu steigern und gleichzeitig systemische Toxizität zu reduzieren, sowie eine wirkliche Alternative für die IV Chemotherapie zu etablieren. Um dies zu erreichen sind Messungen der Medikamentenkonzentration in Gewebeproben unter experimentellen Bedingungen notwendig. Die vorliegende Arbeit untersucht die Konzentration gängiger Chemotherapeutika im Peritonealgewebe. In einem *ex-vivo* Modell einer invertierten Rinderharnblase (sog. eIBUB Modell) werden die Analysen durchgeführt. Die Gewebekonzentrationen von CIS und DOX wurden in 81 standardisierten transmuralen Stanzbiopsien mit zwei unterschiedlichen Durchmessern (6 und 12 mm) verglichen. Weitere Vergleiche wurden mit oder ohne Abtupfen des Flüssigkeitsfilms auf der Probenoberfläche durchgeführt. Nach der Probenlyophilisierung und automatisierten Homogenisierung des Gewebes mit einem TissueLyser Gerät wurden die DOX-Konzentration durch Chromatographie (HPLC) und die CIS-Konzentration durch Spektrometrie (FAAS) gemessen. Alle Experimente wurden dreifach wiederholt. Die Medikamentenkonzentrationsmessungen wurden verblindet in einem externen, GLP-zertifizierten Labor durchgeführt.

Die Medikamentenkonzentration war in den verschiedenen Rinderharnblasen nicht unterschiedlich (CIS $p=0,783$; DOX $p=0,235$). Es zeigten sich aber Konzentrationsunterschiede in verschiedenen Lokalisationen innerhalb der Harnblasen für CIS ($p=0,03$), aber nicht für DOX ($p=0,66$). Der Durchmesser der Stanzbiopsien hatte einen Einfluss auf die Gewebekonzentration von CIS: bei 6 mm Durchmesser betrug die CIS-Konzentration 23,2 ng/mg (CI 95%: 20,3 – 26,1), bei 12 mm 8,1 ng/mg (CI95% 7,2 – 9,2) ($p<0,001$). Hingegen hatte der Biopsiedurchmesser keinen signifikanten Einfluss ($p=0,25$) auf die DOX-Gewebekonzentration: bei 6 mm betrug diese Konzentration 0,46 ng/mg (CI 95%: 0,29 – 0,62), bei 12 mm 0,43 ng/mg (CI 95%: 0,33 – 0,54).

Das Abtupfen des peritonealen Flüssigkeitsfilms reduzierte signifikanterweise ($p=0,03$) die Gewebekonzentration von DOX 0,64 ng/mg (CI 95%: 0,35 – 0,93) versus 0,28 ng/mg (CI95%: 0,12 – 0,43). Hingegen hatte das Abtupfen der Probenoberfläche keinen signifikanten Einfluss ($p=0,74$) auf die gemessene Gewebekonzentration von CIS: 23,5 ng/mg (CI95% 19,0 - 28,0) auf 22,9 ng/mg (CI95%: 18,9 – 26,9).

Am Beispiel von CIS und DOX zeigte sich, dass die Messung der Medikamentenkonzentration in der Blasenwand durch das Verhältnis Oberfläche und Tiefe der Biopsie sowie Abtupfen der Biopsieoberfläche beeinflusst wird. Abhängig von den getesteten Medikamenten wurden Unterschiede bis zu einem Faktor 3 in den Gewebekonzentrationen gemessen. Die Biopsie-Entnahmetechnik (Stanzbiopsie, Durchmesser, Tiefe) und die präanalytische Probenvorbereitung (Abtupfen, Lyophilisierung, Homogenisierung) müssen standardisiert werden, um zuverlässige pharmakologische Messungen im Gewebe zu gewährleisten.

6 Literaturverzeichnis

- Alberts, David S, PY Liu, Edward V Hannigan, Robert O'Toole, Stephen D Williams, James A Young, Ernest W Franklin, Daniel L Clarke-Pearson, Vinay K Malviya, and Brent DuBeshter. 1996. 'Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer', *New England Journal of Medicine*, 335: 1950-55.
- Alexander Jr, H Richard, David L Bartlett, James F Pingpank, Steven K Libutti, Richard Royal, Marybeth S Hughes, Matthew Holtzman, Nader Hanna, Keli Turner, and Tatiana Beresneva. 2013. 'Treatment factors associated with long-term survival after cytoreductive surgery and regional chemotherapy for patients with malignant peritoneal mesothelioma', *Surgery*, 153: 779-86.
- Álvarez-Cedrón, Loreto, Ma Luisa Sayalero, and José M Lanao. 1999. 'High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues', *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 721: 271-78.
- Auer, Rebecca C, Duvaraga Sivajohanathan, Jim Biagi, James Conner, Erin Kennedy, and Taymaa May. 2020. 'Indications for hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with cytoreductive surgery: A systematic review', *European Journal of Cancer*, 127: 76-95.
- Baratti, Dario, Shigeki Kusamura, Antonello Domenico Cabras, Rossella Bertulli, Ionut Hutanu, and Marcello Deraco. 2013. 'Diffuse malignant peritoneal mesothelioma: long-term survival with complete cytoreductive surgery followed by hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC)', *European Journal of Cancer*, 49: 3140-48.
- Blanco, Ana, Urs Giger-Pabst, Wiebke Solass, Jürgen Zieren, and Marc A Reymond. 2013. 'Renal and hepatic toxicities after pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC)', *Annals of surgical oncology*, 20: 2311-16.
- Broeckx, Glenn, and Patrick Pauwels. 2018. 'Malignant peritoneal mesothelioma: a review', *Translational lung cancer research*, 7: 537.
- Carvalho, Cristina, Renato X Santos, Susana Cardoso, Sónia Correia, Paulo J Oliveira, Maria S Santos, and Paula I Moreira. 2009. 'Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect', *Current medicinal chemistry*, 16: 3267-85.
- Cascales-Campos, Pedro Antonio, J Gil, E Gil, E Feliciangeli, A González-Gil, JJ Parrilla, and P Parrilla. 2014. 'Treatment of microscopic disease with hyperthermic intraoperative intraperitoneal chemotherapy after complete cytoreduction improves disease-free survival in patients with stage IIIC/IV ovarian cancer', *Annals of surgical oncology*, 21: 2383-89.
- Castagna, Arianna, Iaroslav Sautkin, Frank-Jürgen Weinreich, Hannah Heejung Lee, Alfred Königsrainer, Marc André Reymond, and Giorgi Nadiradze. 2021. 'Influence of pre-analytical sample preparation on drug concentration measurements in peritoneal tissue: an ex-vivo study', *Pleura and Peritoneum*, 6: 131-36.

- Castagna, Arianna, Alexandra J Zander, Iaroslav Sautkin, Marc Schneider, Ranjita Shegokar, Alfred Königsrainer, and Marc André Reymond. 2020. 'Enhanced intraperitoneal delivery of charged, aerosolized curcumin nanoparticles by electrostatic precipitation', *Nanomedicine*.
- Chu, David ZJ, Nicholas P Lang, Carolyn Thompson, Paul K Osteen, and Kent C Westbrook. 1989. 'Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors', *Cancer*, 63: 364-67.
- Coccolini, Federico, Federico Gheza, Marco Lotti, Salvatore Virzi, Domenico Iusco, Claudio Ghermandi, Rita Melotti, Gianluca Baiocchi, Stefano Maria Giulini, and Luca Ansaloni. 2013. 'Peritoneal carcinomatosis', *World journal of gastroenterology: WJG*, 19: 6979.
- Dakwar, George R, Molood Shariati, Wouter Willaert, Wim Ceelen, Stefaan C De Smedt, and Katrien Remaut. 2017. 'Nanomedicine-based intraperitoneal therapy for the treatment of peritoneal carcinomatosis—Mission possible?', *Advanced drug delivery reviews*, 108: 13-24.
- Davigo, Axel, Guillaume Passot, Olivia Vassal, Muriel Bost, Clément Tavernier, Evelyne Decullier, Naoual Bakrin, Mohammad Alyami, Jeanne-Marie Bonnet, and Vanessa Louzier. 2020. 'PIPAC versus HIPEC: cisplatin spatial distribution and diffusion in a swine model', *International Journal of Hyperthermia*, 37: 144-50.
- de Bree, Eelco, Dimosthenis Michelakis, Dimitris Stamatiou, John Romanos, and Odysseas Zoras. 2017. 'Pharmacological principles of intraperitoneal and bidirectional chemotherapy', *Pleura and Peritoneum*, 2: 47-62.
- Dedrick, Robert L, and Michael F Flessner. 1997. 'Pharmacokinetic problems in peritoneal drug administration: tissue penetration and surface exposure', *Journal of the National Cancer Institute*, 89: 480-87.
- Dedrick, Robert L, Charles E Myers, Peter M Bungay, and VT DeVita. 1978. 'Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration', *Cancer Treat Rep*, 62: 1-13.
- Desai, Jay P, and Fady Moustarah. 2019. 'Cancer, Peritoneal Metastasis'. Dictionary, Online Etymology. 'peritoneum (n.)'. <https://www.etymonline.com/word/peritoneum>.
- DiZerega, Gere S, and Kathleen E Rodgers. 2012. *The peritoneum* (Springer Science & Business Media).
- Dupont, Stéphanie, Eduardo RC Schiffer, Marion J White, John RA Diaper, Marc-Joseph Licker, and Philippe C Masouyé. 2018. 'Changes in hepatic blood flow and liver function during closed abdominal hyperthermic intraperitoneal chemotherapy following cytoreduction surgery', *Gastroenterology research and practice*, 2018.
- Eichler, Hans-Georg, and Markus Müller. 1998. 'Drug distribution', *Clinical pharmacokinetics*, 34: 95-99.
- Elias, D, F Blot, A El Otmany, S Antoun, P Lasser, V Boige, P Rougier, and M Ducreux. 2001. 'Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy', *Cancer*, 92: 71-76.
- Elias, Dominique, François Gilly, Florent Boutitie, François Quenet, Jean-Marc Bereder, Baudouin Mansvelt, Gérard Lorimier, Pierre Dube, and Olivier

- Glehen. 2010. 'Peritoneal colorectal carcinomatosis treated with surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: retrospective analysis of 523 patients from a multicentric French study', *J Clin Oncol*, 28: 63-68.
- Esquis, Philippe, David Consolo, Guy Magnin, Philippe Pointaire, Philippe Moretto, Maria Dolores Ynsa, Jean-Luc Beltramo, Carole Drogoul, Michel Simonet, and Laurent Benoit. 2006. 'High intra-abdominal pressure enhances the penetration and antitumor effect of intraperitoneal cisplatin on experimental peritoneal carcinomatosis', *Annals of surgery*, 244: 106.
- Eveno, Clarisse, Aminata Haidara, Ibrahim Ali, Cynthia Pimpie, Massoud Mirshahi, and Marc Pocard. 2017. 'Experimental pharmacokinetics evaluation of chemotherapy delivery by PIPAC for colon cancer: first evidence for efficacy', *Pleura and Peritoneum*, 2: 103-09.
- Farago, ME, and PJ Parsons. 1982. 'Determination of platinum, palladium and rhodium by atomic-absorption spectroscopy with electrothermal atomisation', *Analyst*, 107: 1218-28.
- Flessner, Michael F. 2008. "Distributed model of peritoneal transport: implications of the endothelial glycocalyx." In.: Oxford University Press.
- . 2016. 'Pharmacokinetic problems in peritoneal drug administration: an update after 20 years', *Pleura and Peritoneum*, 1: 183-91.
- Galluzzi, L, L Senovilla, I Vitale, J Michels, I Martins, O Kepp, M Castedo, and G Kroemer. 2012. 'Molecular mechanisms of cisplatin resistance', *Oncogene*, 31: 1869-83.
- Glehen, O, F Kwiatkowski, PH Sugarbaker, D Elias, EA Levine, M De Simone, R Barone, Y Yonemura, F Cavaliere, and F Quenet. 2004. 'Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a multi-institutional study', *Journal of Clinical Oncology*, 22: 3284-92.
- Glehen, Olivier, François N Gilly, Florent Boutitie, Jean M Bereder, François Quenet, Lucas Sideris, Baudouin Mansvelt, Gérard Lorimier, Simon Msika, and Dominique Elias. 2010. 'Toward curative treatment of peritoneal carcinomatosis from nonovarian origin by cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy: a multi-institutional study of 1290 patients', *Cancer*, 116: 5608-18.
- Glehen, Olivier, François Noel Gilly, Catherine Arvieux, Eddy Cotte, Florent Boutitie, Baudouin Mansvelt, Jean Marc Bereder, Gérard Lorimier, François Quenet, and Dominique Elias. 2010. 'Peritoneal carcinomatosis from gastric cancer: a multi-institutional study of 159 patients treated by cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy', *Annals of surgical oncology*, 17: 2370-77.
- Gockel, Ines, Boris Jansen-Winkel, Linda Haase, Philipp Rhode, Matthias Mehdorn, Stefan Niebisch, Yusef Moulla, Orestis Lyros, Florian Lordick, and Katrin Schierle. 2018. 'Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) in gastric cancer patients with peritoneal metastasis (PM): results of a single-center experience and register study', *Journal of gastric cancer*, 18: 379-91.
- Goéré, Diane, Amine Souadka, Matthieu Faron, Alexis S Cloutier, Benjamin Viana, Charles Honoré, Frédéric Dumont, and Dominique Elias. 2015. 'Extent of colorectal peritoneal carcinomatosis: attempt to define a

- threshold above which HIPEC does not offer survival benefit: a comparative study', *Annals of surgical oncology*, 22: 2958-64.
- Goetze, Thorsten Oliver, Salah-Eddin Al-Batran, Urs Pabst, Marc Reymond, Clemens Tempfer, Wolf O Bechstein, Ulli Bankstahl, Ines Gockel, Alfred Königsrainer, and Thomas Kraus. 2018. 'Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) in combination with standard of care chemotherapy in primarily untreated chemo naïve upper GI-adenocarcinomas with peritoneal seeding—a phase II/III trial of the AIO/CAOGI/ACO', *Pleura and Peritoneum*, 3.
- Goldberg, Stanley. 2008. 'Mechanical/physical methods of cell disruption and tissue homogenization', *2D PAGE: Sample preparation and fractionation*: 3-22.
- González-Moreno, Santiago, Luis A González-Bayón, and Gloria Ortega-Pérez. 2010. 'Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: rationale and technique', *World journal of gastrointestinal oncology*, 2: 68.
- Goodman, Martin D, Sarah McPartland, Danielle Detelich, and Muhammad Wasif Saif. 2016. 'Chemotherapy for intraperitoneal use: a review of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and early post-operative intraperitoneal chemotherapy', *Journal of gastrointestinal oncology*, 7: 45.
- Graversen, Martin, Sönke Detlefsen, Claus Frstrup, Per Pfeiffer, and Michael Bau Mortensen. 2018. 'Adjuvant pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) in resected high-risk colon cancer patients—study protocol for the PIPAC-OPC3 trial. A prospective, controlled phase 2 study', *Pleura and Peritoneum*, 3.
- Harmon, Rhonda L, and Paul H Sugarbaker. 2005. "Prognostic indicators in peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer." In *International Seminars in Surgical Oncology*, 1-10. BioMed Central.
- Hasovits, Csilla, and Stephen Clarke. 2012. 'Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intraperitoneal cancer chemotherapeutics', *Clinical pharmacokinetics*, 51: 203-24.
- Healy, JC, and RH Reznick. 2000. 'Peritoneal anatomy', *Imaging*, 12: 1-9.
- Heldin, Carl-Henrik, Kristofer Rubin, Kristian Pietras, and Arne Östman. 2004. 'High interstitial fluid pressure—an obstacle in cancer therapy', *Nature Reviews Cancer*, 4: 806-13.
- Helm, Joseph H, John T Miura, Jason A Glenn, Rebecca K Marcus, Gregory Larrieux, Thejus T Jayakrishnan, Amy E Donahue, T Clark Gamblin, Kiran K Turaga, and Fabian M Johnston. 2015. 'Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for malignant peritoneal mesothelioma: a systematic review and meta-analysis', *Annals of surgical oncology*, 22: 1686-93.
- Horvath, Philipp, Stefan Beckert, Florian Struller, Alfred Königsrainer, and Marc André Reymond. 2018. 'Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) for peritoneal metastases of pancreas and biliary tract cancer', *Clinical & experimental metastasis*, 35: 635-40.
- Huang, Chao-Qun, Yao Min, Shu-Yi Wang, Xiao-Jun Yang, Yang Liu, Bin Xiong, Yutaka Yonemura, and Yan Li. 2017. 'Cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy improves survival for

- peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of current evidence', *Oncotarget*, 8: 55657.
- Jacquet, Pierre, Andrew Averbach, O Anthony Stuart, David Chang, and Paul H Sugarbaker. 1997. 'Hyperthermic intraperitoneal doxorubicin: pharmacokinetics, metabolism, and tissue distribution in a rat model', *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 41: 147-54.
- Jacquet, Pierre, and Paul H Sugarbaker. 1996a. 'Peritoneal-plasma barrier', *Peritoneal carcinomatosis: principles of management*: 53-63.
- Jacquet, Pierre, O Anthony Stuart, David Chang, and Paul H Sugarbaker. 1996. 'Effects of intra-abdominal pressure on pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin after intraperitoneal administration', *Anti-cancer drugs*, 7: 596-603.
- Jacquet, PPHS, and PH Sugarbaker. 1996b. 'Current methodologies for clinical assessment of patients with peritoneal carcinomatosis', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 15: 49-58.
- Johnson-Arbor, Kelly, and Ramin Dubey. 2017. 'Doxorubicin'.
- Kakchekeeva, Tinatin, Cedric Demtröder, Nirmitha I Herath, Dominic Griffiths, Jared Torkington, Wiebke Solaß, Marie Dutreix, and Marc A Reymond. 2016. 'In vivo feasibility of electrostatic precipitation as an adjunct to pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (ePIPAC)', *Annals of surgical oncology*, 23: 592-98.
- Kawasaki, Hidenori, Toshinori Shimanouchi, and Yukitaka Kimura. 2019. 'Recent development of optimization of lyophilization process', *Journal of chemistry*, 2019.
- Khosrawipour, Veria, Tanja Khosrawipour, David Diaz-Carballo, Eckart Förster, Jürgen Zieren, and Urs Giger-Pabst. 2016. 'Exploring the spatial drug distribution pattern of pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC)', *Annals of surgical oncology*, 23: 1220-24.
- Khosrawipour, Veria, Tanja Khosrawipour, Alexander Jens Peter Kern, Aras Osma, Burak Kabakci, David Diaz-Carballo, Eckart Förster, Jürgen Zieren, and Khashayar Fakhrian. 2016. 'Distribution pattern and penetration depth of doxorubicin after pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) in a postmortem swine model', *Journal of cancer research and clinical oncology*, 142: 2275-80.
- Kirwan, Jennifer A, Lorraine Brennan, David Broadhurst, Oliver Fiehn, Marta Cascante, Warwick B Dunn, Michael A Schmidt, and Vidya Velagapudi. 2018. 'Preanalytical processing and biobanking procedures of biological samples for metabolomics research: A white paper, community perspective (for "Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group"—The Metabolomics Society Initiative)', *Clinical Chemistry*, 64: 1158-82.
- Kurtz, Florian, Florian Struller, Philipp Horvath, Wiebke Solass, Hans Bösmüller, Alfred Königsrainer, and Marc A Reymond. 2018. 'Feasibility, safety, and efficacy of pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) for peritoneal metastasis: a registry study', *Gastroenterology research and practice*, 2018.
- Kusamura, Shigeki, Norfarizan Azmi, Luca Fumagalli, Dario Baratti, Marcello Guaglio, Adalberto Cavalleri, Giulia Garrone, Luigi Battaglia, Francesco

- Barretta, and Marcello Deraco. 2021. 'Phase II randomized study on tissue distribution and pharmacokinetics of cisplatin according to different levels of intra-abdominal pressure (IAP) during HIPEC (NCT02949791)', *European Journal of Surgical Oncology*, 47: 82-88.
- Kusamura, Shigeki, Elias Dominique, Dario Baratti, Rami Younan, and Marcello Deraco. 2008. 'Drugs, carrier solutions and temperature in hyperthermic intraperitoneal chemotherapy', *Journal of surgical oncology*, 98: 247-52.
- Leebmann, H, and P Piso. 2019. 'Hypertherme intraperitoneale chemotherapie', *Der Chirurg*, 90: 593-604.
- Lehmann, K, W Solaß, L Roth, C Tempfer, and MA Reymond. 2018. 'Stellenwert der PIPAC bei fortgeschrittener peritonealer Metastasierung.' in, *Peritoneale Tumoren und Metastasen* (Springer).
- Li, Pei, and Michael G Bartlett. 2014. 'A review of sample preparation methods for quantitation of small-molecule analytes in brain tissue by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)', *Analytical Methods*, 6: 6183-207.
- Löke, Daan R, Roxan FCPA Helderma, Nicolaas AP Franken, Arlene L Oei, Pieter J Tanis, Johannes Crezee, and H Petra Kok. 2021. 'Simulating drug penetration during hyperthermic intraperitoneal chemotherapy', *Drug Delivery*, 28: 145-61.
- Los, Gerrit, and J Gordon McVie. 1990. 'Experimental and clinical status of intraperitoneal chemotherapy', *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 26: 755-62.
- Lotti, Marco, Michela Giulii Capponi, Dario Piazzalunga, Elia Poiasina, Michele Pisano, Roberto Manfredi, and Luca Ansaloni. 2016. 'Laparoscopic HIPEC: a bridge between open and closed-techniques', *Journal of Minimal Access Surgery*, 12: 86.
- Magnette, A, Marc Chatelain, Bernard Chatelain, H Ten Cate, and François Mullier. 2016. 'Pre-analytical issues in the haemostasis laboratory: guidance for the clinical laboratories', *Thrombosis journal*, 14: 1-14.
- Mann, Henry B, and Donald R Whitney. 1947. 'On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other', *The annals of mathematical statistics*: 50-60.
- Markman, Maurie. 2003. 'Intraperitoneal antineoplastic drug delivery: rationale and results', *The lancet oncology*, 4: 277-83.
- Markman, Maurie, Brian N Bundy, David S Alberts, Jeffrey M Fowler, Daniel L Clark-Pearson, Linda F Carson, Scott Wadler, and Joshua Sickel. 2001. 'Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group', *Journal of Clinical Oncology*, 19: 1001-07.
- Nadiradze, Giorgi, Urs Giger-Pabst, Juergen Zieren, Dirk Strumberg, Wiebke Solass, and Marc-André Reymond. 2016. 'Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) with low-dose cisplatin and doxorubicin in gastric peritoneal metastasis', *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 20: 367-73.

- Nadiradze, Giorgi, Philipp Horvath, Yaroslav Sautkin, Rami Archid, Frank-Jürgen Weinreich, Alfred Königsrainer, and Marc A Reymond. 2020. 'Overcoming drug resistance by taking advantage of physical principles: pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC)', *Cancers*, 12: 34.
- Nagy, Janice A, and Robert W Jackman. 1998. "Anatomy and physiology of the peritoneal membrane." In *Seminars in dialysis*, 49-56. Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK.
- Nowacki, Maciej, Mohammad Alyami, Laurent Villeneuve, Frederic Mercier, Martin Hubner, Wouter Willaert, Wim Ceelen, Marc Reymond, Denis Pezet, and Catherine Arvieux. 2018. 'Multicenter comprehensive methodological and technical analysis of 832 pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) interventions performed in 349 patients for peritoneal carcinomatosis treatment: an international survey study', *European Journal of Surgical Oncology*, 44: 991-96.
- Odendahl, K, W Solass, C Demröder, U Giger-Pabst, J Zieren, C Tempfer, and MA Reymond. 2015. 'Quality of life of patients with end-stage peritoneal metastasis treated with Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC)', *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 41: 1379-85.
- Quenet, François, Dominique Elias, Lise Roca, Diane Goere, Laurent Ghouti, Marc Pocard, Olivier Facy, Catherine Arvieux, Gerard Lorimier, and Denis Pezet. 2018. 'A UNICANCER phase III trial of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for colorectal peritoneal carcinomatosis (PC): PRODIGE 7', *J Clin Oncol*, 36: 3503.
- Rau, Beate, Andreas Brandl, Pompiliu Piso, Jörg Pelz, Peter Busch, Cedric Demröder, Silke Schüle, Hans-Juergen Schlitt, Marc Roitman, and Jürgen Tepel. 2020. 'Peritoneal metastasis in gastric cancer: results from the German database', *Gastric Cancer*, 23: 11-22.
- Reymond, Marc André, Bing Hu, A Garcia, T Reck, F Köckerling, J Hess, and Philippe Morel. 2000. 'Feasibility of therapeutic pneumoperitoneum in a large animal model using a microvaporisator', *Surgical endoscopy*, 14: 51-55.
- Reymond, Marc, Cedric Demtroeder, Wiebke Solass, Guido Winnekendonk, and Clemens Tempfer. 2016. 'Electrostatic precipitation pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (ePIPAC): first in-human application', *Pleura and peritoneum*, 1: 109-16.
- Rippe, Bengt, and Raymond Theodorus Krediet. 1994. 'Peritoneal physiology-transport of solutes.' in, *The textbook of peritoneal dialysis* (Springer).
- Robella, Manuela, Marco Vaira, Monica Argenziano, Rita Spagnolo, Roberta Cavalli, Alice Borsano, Sergio Gentilli, and Michele De Simone. 2019. 'Exploring the Use of Pegylated Liposomal Doxorubicin (Caelyx®) as Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy', *Frontiers in pharmacology*, 10: 669.
- Rossi, Carlo Riccardo, Simone Mocellin, Pierluigi Pilati, Mirto Foletto, Luigi Quintieri, Pietro Palatini, and Mario Lise. 2003. 'Pharmacokinetics of intraperitoneal cisplatin and doxorubicin', *Surgical Oncology Clinics*, 12: 781-94.

- Roviello, F, S Caruso, A Neri, and D Marrelli. 2013. 'Treatment and prevention of peritoneal carcinomatosis from gastric cancer by cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: overview and rationale', *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 39: 1309-16.
- Roviello, Franco, Stefano Caruso, Daniele Marrelli, Corrado Pedrazzani, Alessandro Neri, Alfonso De Stefano, and Enrico Pinto. 2011. 'Treatment of peritoneal carcinomatosis with cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: state of the art and future developments', *Surgical oncology*, 20: e38-e54.
- Roviello, Franco, Enrico Pinto, Giovanni Corso, Corrado Pedrazzani, Stefano Caruso, Marco Filippeschi, Roberto Petrioli, Stefania Marsili, Maria Antonietta Mazzei, and Daniele Marrelli. 2010. 'Safety and potential benefit of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in peritoneal carcinomatosis from primary or recurrent ovarian cancer', *Journal of surgical oncology*, 102: 663-70.
- Sautkin, Iaroslav, Wiebke Solass, Frank-Jürgen Weinreich, Alfred Königsrainer, Martin Schenk, Karolin Thiel, and Marc A Reymond. 2019. 'A real-time ex vivo model (eIBUB) for optimizing intraperitoneal drug delivery as an alternative to living animal models', *Pleura and Peritoneum*, 4.
- Schneider, Marcel André, Janina Eden, Basile Pache, Felix Laminger, Victor Lopez-Lopez, Thomas Steffen, Martin Hübner, Friedrich Kober, Sebastian Roka, and Pedro Cascales Campos. 2018. 'Mutations of RAS/RAF proto-oncogenes impair survival after cytoreductive surgery and HIPEC for peritoneal metastasis of colorectal origin', *Annals of surgery*, 268: 845-53.
- Schnelle, Daniel, Frank-Jürgen Weinreich, Janek Kibat, and Marc A Reymond. 2017. 'A new ex vivo model for optimizing distribution of therapeutic aerosols: the (inverted) bovine urinary bladder', *Pleura and Peritoneum*, 2: 37-41.
- Smith, Kerri M, and Yan Xu. 2012. 'Tissue sample preparation in bioanalytical assays', *Bioanalysis*, 4: 741-49.
- Smith, Margaret E, and Hari Nathan. 2019. 'Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: safety is only half of the story', *JAMA Network Open*, 2: e186839-e39.
- Solaß, Wiebke, Urs Giger-Pabst, Jürgen Zieren, and Marc A Reymond. 2013. 'Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC): occupational health and safety aspects', *Annals of surgical oncology*, 20: 3504-11.
- Solass, Wiebke, Aurélie Herbette, Tina Schwarz, Alexander Hetzel, Jian-Sheng Sun, Marie Dutreix, and Marc A Reymond. 2012. 'Therapeutic approach of human peritoneal carcinomatosis with Dbait in combination with capnoperitoneum: proof of concept', *Surgical endoscopy*, 26: 847-52.
- Solaß, Wiebke, Alexander Hetzel, Giorgi Nadiradze, Emil Sagynaliev, and Marc A Reymond. 2012. 'Description of a novel approach for intraperitoneal drug delivery and the related device', *Surgical endoscopy*, 26: 1849-55.
- Solass, Wiebke, Reinhold Kerb, Thomas Mürdter, Urs Giger-Pabst, Dirk Strumberg, Clemens Tempfer, Jürgen Zieren, Matthias Schwab, and Marc André Reymond. 2014. 'Intraperitoneal chemotherapy of peritoneal carcinomatosis using pressurized aerosol as an alternative to liquid

- solution: first evidence for efficacy', *Annals of surgical oncology*, 21: 553-59.
- Solass, Wiebke, Christine Sempoux, Sönke Detlefsen, Norman J Carr, and Frédéric Bibeau. 2016. 'Peritoneal sampling and histological assessment of therapeutic response in peritoneal metastasis: proposal of the Peritoneal Regression Grading Score (PRGS)', *Pleura and Peritoneum*, 1: 99-107.
- Somashekhar, SP, Rohit Kumar, Amit Rauthan, Poonam Patil, Priya Kapoor, Susmita Rakshit, and Ashwin K Rajgopal. 2022. "Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) versus intravenous chemotherapy in unresectable peritoneal metastases secondary to platinum-resistant ovarian cancer: Interim analysis of Indian randomized control trial." In.: American Society of Clinical Oncology.
- St, Lars, and Svante Wold. 1989. 'Analysis of variance (ANOVA)', *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 6: 259-72.
- Struller, Florian, Philipp Horvath, Wiebke Solass, Frank-Jürgen Weinreich, Dirk Strumberg, Marios K Kokkalis, Imma Fischer, Christoph Meisner, Alfred Königsrainer, and Marc A Reymond. 2019. 'Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy with low-dose cisplatin and doxorubicin (PIPAC C/D) in patients with gastric cancer and peritoneal metastasis: a phase II study', *Therapeutic advances in medical oncology*, 11: 1758835919846402.
- Sugarbaker, Paul. 2016. 'Management of peritoneal metastases using cytoreductive surgery and perioperative chemotherapy.' in, *INTRAPERITONEAL CANCER THERAPY PRINCIPLES AND PRACTICE* (Taylor & Francis Group, LLC).
- Sugarbaker, Paul H. 1995. 'Peritonectomy procedures', *Annals of surgery*, 221: 29.
- . 1998. "Intraperitoneal chemotherapy and cytoreductive surgery for the prevention and treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis." In *Seminars in surgical oncology*, 254-61. Wiley Online Library.
- . 2009. 'Cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy for the treatment of advanced primary and recurrent ovarian cancer', *Current opinion in obstetrics and Gynecology*, 21: 15-24.
- . 2012. *Peritoneal carcinomatosis: drugs and diseases* (Springer Science & Business Media).
- . 2018. 'Peritoneal metastases, a frontier for progress', *Surgical Oncology Clinics*, 27: 413-24.
- Sugarbaker, Paul H, Kurt Van der Speeten, and O Anthony Stuart. 2010. 'Pharmacologic rationale for treatments of peritoneal surface malignancy from colorectal cancer', *World journal of gastrointestinal oncology*, 2: 19.
- Tempfer, Clemens B, Urs Giger-Pabst, Veronika Seebacher, Miriam Petersen, Askin Dogan, and Günther A Reznicek. 2018. 'A phase I, single-arm, open-label, dose escalation study of intraperitoneal cisplatin and doxorubicin in patients with recurrent ovarian cancer and peritoneal carcinomatosis', *Gynecologic oncology*, 150: 23-30.
- Tempfer, Clemens B, Ziad Hilal, Askin Dogan, Miriam Petersen, and Günther A Reznicek. 2018. 'Concentrations of cisplatin and doxorubicin in ascites

- and peritoneal tumor nodules before and after pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) in patients with peritoneal metastasis', *European Journal of Surgical Oncology*, 44: 1112-17.
- Toussaint, Laura, Yaroslav Sautkin, Barbara Illing, Frank-Jürgen Weinreich, Giorgi Nadiradze, Alfred Königsrainer, and Dörte Wichmann. 2021. 'Comparison between microcatheter and nebulizer for generating Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC)', *Surgical endoscopy*, 35: 1636-43.
- Urano, M. 1999. 'Invited review: for the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures', *International Journal of Hyperthermia*, 15: 79-107.
- van Asperen, Judith, Olaf van Tellingen, and Jos H Beijnen. 1998. 'Determination of doxorubicin and metabolites in murine specimens by high-performance liquid chromatography', *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 712: 129-43.
- Van Baal, JOAM, KK Van de Vijver, R Nieuwland, CJF Van Noorden, WJ Van Driel, A Sturk, GG Kenter, LG Rikkert, and CAR Lok. 2017. 'The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum', *Tissue and Cell*, 49: 95-105.
- Van Eden, WJ, NFM Kok, P Snaebjornsson, K Józwiak, K Woensdregt, PD Bottenberg, H Boot, and AGJ Aalbers. 2019. 'Factors influencing long-term survival after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for pseudomyxoma peritonei originating from appendiceal neoplasms', *BJS open*, 3: 376-86.
- Wood, MJ, WJ Irwin, and DK Scott. 1990. 'Photodegradation of doxorubicin, daunorubicin and epirubicin measured by high-performance liquid chromatography', *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 15: 291-300.
- Xue, YJ, Hong Gao, Qin C Ji, Zamas Lam, XinPing Fang, Zhongping Lin, Matthew Hoffman, Daniel Schulz-Jander, and Naidong Weng. 2012. 'Bioanalysis of drug in tissue: current status and challenges', *Bioanalysis*, 4: 2637-53.
- Yan, Tristan D, Marcello Deraco, Dominique Elias, Olivier Glehen, Edward A Levine, Brendan J Moran, David L Morris, Terence C Chua, Pompiliu Piso, and Paul H Sugarbaker. 2011. 'A novel tumor-node-metastasis (TNM) staging system of diffuse malignant peritoneal mesothelioma using outcome analysis of a multi-institutional database', *Cancer*, 117: 1855-63.
- Yonemura, Yutaka, Ayman Elnemr, Yoshio Endou, Mitsumasa Hirano, Akiyoshi Mizumoto, Nobuyuki Takao, Masumi Ichinose, Masahiro Miura, and Yan Li. 2010. 'Multidisciplinary therapy for treatment of patients with peritoneal carcinomatosis from gastric cancer', *World journal of gastrointestinal oncology*, 2: 85.
- Yonemura, Yutaka, Ayman Elnemr, Yoshio Endou, Haruaki Ishibashi, Akiyoshi Mizumoto, Masahiro Miura, and Yan Li. 2012. 'Effects of neoadjuvant intraperitoneal/systemic chemotherapy (bidirectional chemotherapy) for the treatment of patients with peritoneal metastasis from gastric cancer', *International Journal of Surgical Oncology*, 2012.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik Tübingen, in der Abteilung für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Alfred Königsrainer sowie unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Marc A. Reymond durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Königsrainer, Doktorvater, Prof. Marc Reymond, Betreuer, Dr. med. Giorgi Nadiradze, Oberarzt, Herrn Dr. hum. biol. Frank-Jürgen Weinreich, Laborleitung und Frau Dr. med. Hannah Heejong Lee, Assistenzärztin.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch den Laborleiter Dr. Frank-Jürgen Weinreich von mir durchgeführt. Die PIPAC Aerosolisierung wurde zusammen mit Herrn Iaroslav Sautkin durchgeführt.

Die DOX Messungen wurden durch Hochdruckchromatographie und die CIS Messungen durch Atomabsorptionsspektrometrie in einem externen Labor (Dr. Eberhard & Partner, Dortmund) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von Prof. Dr. Marc Reymond durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 12.01.2023

Arianna Castagna

8 Veröffentlichungen

Teile der Dissertation wurden veröffentlicht:

Castagna A, Sautkin I, Weinreich F-J, Lee HH, Königsrainer A, Reymond MA, Nadiradze G, Influence of pre-analytical sample preparation on drug concentration measurements in peritoneal tissue: an ex-vivo study. *Pleura and peritoneum*. 2021;6(3):131-6.

9 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. med. Alfred Königsrainer für die Möglichkeit der Mitarbeit in der Klinik für Allgemeine-, Viszeral- und Transplantationschirurgie sowohl im Rahmen dieses wissenschaftlichen Projektes als auch für meine chirurgische Weiterbildung bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Marc Reymond für die Betreuung in der Arbeitsgruppe sowie der Einbindung im Nationalen Zentrum für Pleura und Peritoneum (NCPD). Ebenfalls bedanke ich mich für die methodologische Planung dieser Dissertation.

Für die Einarbeitung in die PIPAC-Technik, die sorgfältige Einweisung zur Durchführung sämtlicher Versuche mit Zytostatika im Rahmen der maximalen Arbeitssicherheit und die wissenschaftliche Mitbetreuung möchte ich mich bei Dr. hum. biol. Frank-Jürgen Weinreich bedanken.

Vielen Dank auch an Oberarzt Dr. med. Giorgi Nadiradze, der mich in dem Klinikalltag unterstützte und meine chirurgische Weiterbildung fördert. Weiterhin gilt mein Dank meinen Kolleginnen und Kollegen die mich täglich motivierten.